

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med.dent. R. Hickel

**Assoziation von funktionell wirksamen Polymorphismen im
humanen DMBT1- Gen mit der Pathogenese der chronischen
Parodontitis**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eva Zimmermann

aus
Hamburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.med. Dr. med.dent. M. Folwaczny
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Elke Holinski-Feder
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Dipl.-biol. Jürgen Glas
Dekan:	Prof.Dr.med. Dr.h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	24.06.2013

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Allgemeines und Epidemiologie der Parodontitiden</i>	1
1.1.1	Epidemiologische Daten.....	2
1.1.2	Klassifikation der Parodontitis.....	3
1.1.3	Klinische Manifestationen der Parodontitis und ihre Therapie	5
1.2	<i>Ätiologie und Pathogenese der parodontalen Erkrankungen</i>	7
1.2.1	Direkte, mikrobiell bedingte Gewebedestruktion	11
1.2.2	Immunologie	13
1.2.3	Unspezifische und spezifische Abwehr	13
1.2.4	Epidemiologische Risikofaktoren der Parodontitis.....	16
1.3	<i>Genetik der Parodontitiden.....</i>	18
1.3.1	Genetische Polymorphismen (Single Nucleotid Polymorphismen)	18
1.3.2	Kopplungs- und Assoziationsanalysen.....	21
1.3.3	Einfluss von SNPs auf die Pathogenese der Parodontitis	23
1.4	<i>Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1)</i>	25
1.4.1	Die Struktur des DMBT1 Gens	27
2	Zielsetzung.....	29
3	Material	30
3.1	<i>Studienpopulation.....</i>	30
3.1.1	Patientengruppe.....	30
3.1.2	Kontrollgruppe	31
3.2	<i>Polymorphismen</i>	32
3.2.1	PCR-Primer	32
3.2.2	Hybridisierungssonden.....	34
3.2.3	Gelelektrophorese.....	36
3.3	<i>Materialien für die Genotypisierung</i>	37
3.3.1	PCR-Material, PCR-Kits und Sequenzierungs-Kits	37
3.4	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	38
3.5	<i>Geräte</i>	38
3.6	<i>Software.....</i>	40

4	Methoden	41
4.1	<i>Allgemeine Vorgehensweise</i>	41
4.2	<i>Molekular- und zellbiologische Vorgehensweise.....</i>	41
4.2.1	PCR (Polymerasenkettenreaktion).....	41
4.2.2	Das LightCycler®480 System	46
4.2.3	Genotypisierung mit dem LightCycler®480	46
4.2.3.1	Ablauf der Realtime-PCR.....	48
4.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
4.2.5	Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten	53
4.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	54
4.3	<i>Statistische Analysen</i>	54
4.3.1	Berechnung des Kopplungsungleichgewichts	55
4.4	<i>Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.....</i>	56
4.5	<i>Bonferroni-Korrektur.....</i>	57
5	Ergebnisse.....	58
5.1	<i>Allgemeine Vorbemerkungen.....</i>	58
5.2	<i>Demographische Daten der Studienpopulation</i>	59
5.3	<i>Polymorphismen im DMBT1-Gen.....</i>	60
5.3.1	Polymorphismus rs2981745 (SNP – 93)	60
5.3.2	Polymorphismus rs2981778	61
5.3.3	Polymorphismus rs11523871 (p.Pro42Thr).....	62
5.3.4	Polymorphismus rs3013236 (p.Leu54Ser).....	63
5.3.5	Polymorphismus rs2981804	64
5.3.6	Polymorphismus rs2277244 (p.His585Tyr).....	65
5.3.7	Polymorphismus rs1052715 (p.Pro1707Pro) (SNP2348)	66
5.4	<i>Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele in der Gesamtpopulation</i>	67
5.5	<i>Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele in Bezug zum Rauchverhalten</i>	68
5.5.1	Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Raucher	68
5.5.2	Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Nichtraucher.....	70
5.6	<i>Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele in Bezug zum Geschlecht.....</i>	71
5.6.1	Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Frauen	71
5.6.2	Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Männer	72

III

5.6.3	Kopplungsungleichgewicht.....	74
5.7	Haplotypenfrequenzen im <i>DMBT1</i> -Gen	76
5.7.1	Haplotypenfrequenzen im <i>DMBT1</i> -Gen bei chronischer Parodontitis	76
5.8	Ergebniszusammenfassung nach angewandter Bonferroni-Korrektur	79
6	Diskussion	81
6.1	Studiendesign.....	81
6.1.1	Eigenes Studiendesign.....	84
6.1.2	Validität der Genotypisierungsmethoden	86
6.1.3	Grundlagen der DNA-Quantifizierung durch Real time-PCR	87
6.2	Hinweise auf eine Rolle von genetischen Faktoren in der Pathogenese der Parodontitis	90
6.2.1	Polymorphismen in Zytokingenen	91
6.2.2	Polymorphismen in Fcγ-Rezeptor Genen	92
6.2.3	Polymorphismen in HLA Genen	92
6.3	Korrelation von <i>DMBT1</i> mit anderen entzündlichen Erkrankungen	94
6.4	Hypothesen zur Rolle der <i>DMBT1</i> - Polymorphismen in der Pathogenese der chronischen Parodontitis	95
6.5	Vergleich der Genotyp- und Allelverteilung der untersuchten Polymorphismen mit Referenzpopulationen und Daten des internationalen HapMap Projekts	96
7	Zusammenfassung	100
8	Abkürzungen und Begriffe.....	102
9	Literaturverzeichnis.....	104
10	Lebenslauf.....	122
11	Danksagung	122

1 Einleitung

1.1 Allgemeines und Epidemiologie der Parodontitiden

Die Parodontopathien stellen eine Gruppe von entzündlichen und nicht entzündlich bedingten Erkrankungen des Zahnhalteapparates mit multifaktorieller Ursache dar. Die Parodontitis wird weltweit als die am häufigsten in der Mundhöhle auftretende Infektionskrankheit betrachtet (Genco, 1996). Verursacht wird sie durch die Interaktion zwischen spezifischen parodontogenen Mikroorganismen und immunologischen Abwehrreaktionen (Reynolds and Meikle, 1997, Page et al., 1997, Silva et al., 2008, Tanner et al., 2007). Es ist erwiesen, dass bestimmte Risikofaktoren, wie chronischer Nikotinabusus (Hyman and Reid, 2003), Stress (Van Dyke and Sheilesh, 2005), Infektion durch spezifische parodontale Keime, Osteoporose (Inagaki et al., 2007, Baldi et al., 2009) und systemische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus (Southerland et al., 2006, Salvi et al., 1997, Oliver et al., 1998), und HIV (Alpagot et al., 2004) Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Immunantwort auf bakterielle Infektionen genetisch determiniert sein können. (Page et al., 1987, Kornman et al., 1997, Kornman and di Giovine, 1998, Craandijk et al., 2002). Andere Studien beobachteten, dass die Parodontitis familiär gehäuft auftritt (Van Dyke et al., 1985, Page et al., 1984). Michalowicz et al. (1991)&(1994) stellte an Hand von Zwillingsstudien eindeutig die Beteiligung genetischer Faktoren an der Pathogenese der chronischen Parodontitis und besonders an der Vielfalt der klinischen Symptome dar (Michalowicz et al., 1991, Michalowicz, 1994).

Einige Autoren, wie *Kornman et al.* (1997), *Galbraith et al.* (1999) und *Craandijk et al.* (2002) stellten die Hypothese auf, dass genetische Polymorphismen entscheidend am Ausmaß einer parodontalen Erkrankung beteiligt sind. *Kornman et al.* beschrieben einen Zusammenhang zwischen dem zusammengesetzten Polymorphismus vom IL-1A-889 und IL-1B+3954 im Interleukin 1-Gen und dem Schweregrad einer chronischen Parodontitis (Kornman et al., 1997). Dabei beschrieb er, dass Patienten mit einem positiven IL-1 β Genotyp 20-mal mehr gefährdet sind eine chronische Parodontitis zu entwickeln, als die Individuen mit negativem Genotyp. Auch *Galbraith et al.* und *Craandijk et al.* konnten diese Assoziation

zwischen IL-1-Genotyp und dem Schweregrad der Parodontitis bestätigen (Galbraith et al., 1999, Craandijk et al., 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von funktionell wirksamen Polymorphismen im humanen DMBT1 Gen auf die Pathogenese der chronischen Parodontitis untersucht.

1.1.1 Epidemiologische Daten

Gegen Ende der 1950er-Jahre begann eine neue Phase für die epidemiologische Wissenschaft bei der Erforschung oraler Erkrankungen. Es wurden allgemein angewendete Beurteilungskriterien für Erkrankungssymptome der chronischen Parodontitis zusammen mit Indizes zur Bestimmung des Plaquebefalls und der Mundhygieneeffektivität eingeführt. Die ermittelten Daten über Prävalenz und Inzidenz von Parodontalerkrankungen führten zum veränderten Verständnis über Ätiologie, Verlauf und Therapiemöglichkeiten der Parodontopathien. Spätere Studien, beschrieben die Parodontopathien sehr detailliert und bemühten sich, die neuen Untersuchungssysteme und die neu erworbenen Erkenntnisse über die Aktivitätszustände und den natürlichen Verlauf der Parodontitis mit einfließen zu lassen (Socransky et al., 1984). Zur Erhebung der Behandlungsanforderungen wurde 1982 der *Community Periodontal Index of Treatment Needs* (CPITN) von WHO und FDI vorgeschlagen.

Die chronische Parodontitis und die Gingivitis stehen aufgrund ihrer hohen Prävalenz im Vordergrund der epidemiologischen Forschung. Parodontalerkrankungen befinden sich laut der *vierten* Ausgabe der *Deutschen Mundgesundheitsstudie* DMS IV auf dem Vormarsch, während die dentale Karies in Deutschland dank intensiver Prophylaxe und guter zahnärztlicher Versorgung weiter auf dem Rückzug ist (Hoffmann, 2006).

Ein Grund für diese aus parodontologischer Sicht negative Entwicklung ist der an sich sehr positive Umstand, dass bei Erwachsenen heute weniger Zähne durch Karies verloren gehen, die erhaltenen Zähne dafür aber mit zunehmendem

Lebensalter ein steigendes Risiko für parodontale Erkrankungen bekommen. So leiden bei Jugendlichen 12,6 Prozent an einer mittelschweren und 0,8 Prozent an einer schweren Parodontitis. Unter den 35- bis 44-Jährigen sind es bereits 52,7 Prozent, die an einer mittelschweren und 20,5 Prozent, welche an einer schweren Form der Parodontitis erkrankt sind. Im Vergleich zur *dritten* Erhebung der *Deutschen Mundgesundheitsstudie* aus dem Jahr 1997, bedeutet dies eine deutliche Zunahme um 26,9 Prozentpunkte der Erkrankungsprävalenz in dieser Altersgruppe.

Unter den 65-74 jährigen Senioren ist die Parodontitis am weitesten verbreitet. Hier sind 48,0 Prozent von einer mittelschweren und 39,8 Prozent von einer schweren Ausprägung der Krankheit betroffen. Das entspricht einer Zunahme von 23,7 Prozentpunkten im Vergleich zum Jahr 1997. Es sind neben dem Lebensalter aber auch andere Faktoren für das Erkrankungsrisiko ausschlaggebend. Wie die aktuelle Studie gezeigt hat, erkranken Männer häufiger als Frauen an einer schweren Parodontitis. Auch Konsumgewohnheiten und der soziale Status zum Beispiel beeinflussen das Risiko. Ein Raucher mit niedrigem Bildungsstand hat ein um den Faktor 3,3 erhöhtes Risiko, an einer schweren Parodontitis zu erkranken (Micheelis, 2006). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen Übergewicht und dem Ausmaß einer Parodontitis, was jedoch wissenschaftlich noch nicht ausreichend geklärt ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass laut den epidemiologischen Ergebnissen der DMS IV in Deutschland ca. 30%-40% aller Erwachsenen unter einer fortgeschrittenen Parodontitis leiden. Das sind bei ca. 82 Millionen Menschen 15 Millionen Patienten (Micheelis, 2006).

1.1.2 Klassifikation der Parodontitis

Seit 1997 wurde in einem internationalen „*Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*“ eine Klassifizierung der parodontalen Erkrankungen durch die *American Academy of Periodontology* (AAP) erarbeitet. Die

Intention dieses Workshops war es, eine Klassifikation der Gingivopathien und die Erneuerung der Klassifikation der Parodontitiden zu etablieren.

Dabei wurden die verschiedenen Formen der gingivalen und parodontalen Erkrankungen in acht Hauptgruppen eingeteilt. Die dabei neu eingeführten Begriffe „*chronische Parodontitis*“ und „*aggressive Parodontitis*“ sollten die alten Begriffe „*adulte Parodontitis*“ sowie „*früh beginnende Parodontitis*“ ablösen, da die verschiedenen Unterformen der Parodontitis prinzipiell in jedem Lebensabschnitt, sowohl in der Milchzahn- als auch der bleibenden Dentition, auftreten können (Armitage, 1999). Im November 1999 wurde diese bis heute gültige Klassifizierung in Oakbrook (Illinois, USA) offiziell vorgestellt (Armitage, 1999).

1. Gingivale Erkrankungen
2. Chronische Parodontitis
3. Aggressive Parodontitis
4. Parodontitis als Manifestation von Systemerkrankungen
5. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
6. Parodontalabszesse
7. Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen
8. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände

Die chronische Parodontitis ist die häufigste Form aller entzündlichen parodontalen Erkrankungen. Sie kann in jedem Lebensalter entstehen, wobei sie nach dem 35. Lebensjahr vermehrt auftritt. Prävalenz und Schwere nehmen mit dem Alter zu. Während die bakterielle Plaque der zwingend notwendige ätiologische Faktor ist, wird die Stärke der Progression durch die immunologische Wirtsreaktivität sowie den Einfluss weiterer exogener Risikofaktoren determiniert.

Die chronische Parodontitis kann nach dem Ausmaß folgendermaßen unterteilt werden (Lindhe, 1999):

- a) Lokalisiert: < 30 % der Zahnflächen befallen.
- b) Generalisiert: > 30 % der Zahnflächen befallen.

Die Einteilung nach dem Schweregrad des klinischen Attachmentverlustes (CAL) unterscheidet drei Stadien: mild (< 3 mm CAL), mäßig (3 - 4 mm CAL), schwer (≥ 5 mm CAL).

Das Krankheitsbild der aggressiven Parodontitis stellt eine Erkrankung mit überwiegend eindeutigen klinischen Befunden dar und lässt sich somit von der chronischen Parodontitis differenzieren. Folgende Hauptkriterien verdeutlichen die Abgrenzung zur chronischen Erkrankung: ein klinisch gesunder Patient, eine rasch fortschreitende Gewebedestruktion und eine auffällige familiäre Häufung mit Auftreten vor dem 35. Lebensjahr. Als weitere Merkmale gelten (DGP 2002a), ein Missverhältnis zwischen der Menge an bakteriellen Ablagerungen und dem Ausmaß der Gewebedestruktion, eine erhöhte Prävalenz der Infektion durch *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und auch von *Porphyromonas gingivalis*.

Unterteilt wird die aggressive Parodontitis in eine lokalisierte oder generalisierte Form (Tonetti and Mombelli, 1999). Bei der lokalisierten Form beginnt die Parodontalerkrankung während der Pubertät. Ein Befall der ersten Molaren und zentralen Inzisivi ist charakteristisch. Serumantikörper gegen nachgewiesene bakterielle Antigene sind eher selten.

Die generalisierte Form zeigt sich meist bei Patienten die jünger als 35 Jahre sind. Es kommt zu einem generalisierten Befall mit Attachmentverlust an mindestens drei Zähnen außer den ersten Molaren und zentralen Inzisivi. Der Verlauf ist schubhaft mit schwachem Serumantikörpernachweis gegen bakterielle Antigene.

1.1.3 Klinische Manifestationen der Parodontitis und ihre Therapie

Nach zwei bis drei Tagen ungestörter Plaqueakkumulation entstehen die ersten klinischen Zeichen einer Gingivitis, wie Rötung und Schwellung der Gingiva sowie verstärkte Tendenz des Weichgewebes zur Blutung.

Entwickelt sich durch das Fortbestehen der Entzündung eine Parodontitis, dann kommt es neben der Blutung der Gingiva zusätzlich zu einem parodontalen Gewebeverlust mit Knochenabbau und nachfolgender Zahnlockerung. Auch eine

Änderung der Zahnstellung ist zu verzeichnen. In akuten Fällen können Schmerzen und Abszessbildungen beobachtet werden. Es zeigen sich jedoch nicht immer diese auffälligen Symptome bei der Entstehung und Fortsetzung einer Parodontitis. Daraus resultiert die Gefahr, dass die Diagnose einer Parodontitis erst in einem weiter fortgeschrittenen Stadium gestellt wird. In dieser Phase der Erkrankung sind aber bereits eindeutige histopathologische Veränderungen des parodontalen Gewebes zu erkennen. Bei der fortgeschrittenen parodontalen Läsion kommt es zum Übergriff der Entzündung auf das Desmodont. Dabei wird der intraalveoläre Knochen- und Kollagenverlust histologisch sichtbar. Gleichzeitig kommt es zur Fibrose der peripheren Gingiva. Im entzündlichen Infiltrat treten vermehrt Plasmazellen, Lymphozyten und Makrophagen auf (Renggli, 1984).

Nach Empfehlung der „*Guidelines for Periodontal Therapy*“ der American Academy of Periodontology (AAP) von 2003, soll der Patient in diesem Stadium Anleitung zur oralen Hygiene erhalten und die Vermeidung bzw. Einstellung von Risikofaktoren wie z.B. Rauchen, Diabetes mellitus, immunsupprimierende Erkrankungen und psychischer Stress beachten. Die supra- und soweit erreichbare subgingivale Plaque sollte in regelmäßigen Abständen entfernt werden. Die Behandlung systemischer Erkrankungen, welche zur Parodontitis beitragen, kann indiziert sein. Andere Zahnerkrankungen wie Karies, Kieferfehlstellungen, mangelhafte prothetische Versorgung sollte therapiert werden. Bei weiterem Fortschritt der Parodontitis kann die chirurgische Therapie der parodontalen Hart- und Weichgewebe notwendig werden. Regenerative und rekonstruktive Maßnahmen zur Defektdeckung oder chirurgisch-ästhetische und okklusal-kieferchirurgische Maßnahmen können ebenfalls sinnvoll sein. Eine unterstützende Antibiotikatherapie kann unter folgenden Umständen indiziert sein (Karch et al., 2003):

Bei Bestehen einer aggressiven Parodontitis (AAP, 2000), bei Vorhandensein einer schweren chronischen Parodontitis, sowie bei Parodontitiden, die trotz vorangegangener Therapie progrediente Attachmentverluste aufweisen (AAP, 2001). Desweiteren bei Parodontalabszessen mit Tendenz zur Ausbreitung in die benachbarten Logen, sowie bei Fieber und/oder ausgeprägter Lymphadenopathie (AAP, 2001, Dahlen, 2002).

Eine begleitende Antibiotikatherapie wird auch bei nekrotisierender, ulzerierender Gingivitis oder Parodontitis mit ausgeprägter Allgemeinsymptomatik (Fieber und/oder ausgeprägter Lymphadenopathie) als medizinisch notwendig erachtet (AAP, 2001)

Außerdem kann eine Antibiotikagabe bei mittelschwerer bis schwerer Parodontitis in Verbindung mit systemischen Erkrankungen oder Zuständen, die die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen notwendig werden. Dabei sollte jedoch besonders auf eine potentielle antibiotikainduzierte Superinfektion durch andere Erreger, wie z.B. *Candida albicans* geachtet werden (AAP, 2000).

Bleibt eine Parodontitis unbehandelt, so findet meist ein langsamer, progredienter parodontaler Attachmentverlust von 0,1 bis 0,3mm pro Jahr statt (Brown and Loe, 1993).

1.2 Ätiologie und Pathogenese der parodontalen Erkrankungen

Die Parodontitis ist eine entzündliche Reaktion auf die hauptsächlich im subgingivalen Bereich vorhandene mikrobielle Plaque. Hierbei ist das gesamte Parodontium befallen. Der begleitende Gewebeverlust ist irreversibel und gilt als Folgeerkrankung der Gingivitis. Sie entsteht jedoch nicht zwangsläufig aus einer vorbestehenden, andauernden Gingivitis (Sheiham and Netuveli, 2002). Wenn sich eine Gingivitis zu einer Parodontitis weiterentwickelt, dauert dies in der Regel mindestens sechs Monate (Brex et al., 1988a). Die Gingivitis ist eine direkte Immunantwort auf die mikrobielle Plaque und umfasst die entzündlichen Läsionen, die sich auf die marginale Gingiva beziehen.

Die Faktoren, die zur Weiterentwicklung von einer Gingivitis zu einer Parodontitis führen, sind noch nicht vollständig geklärt (Fiebig et al., 2008, Kinane, 1999, Diehl et al., 1999). Entscheidend für das Ausmaß der parodontalen Zerstörung ist die Wirtsantwort auf die Plaque durch spezielle parodontopathogene Keime (siehe Abb. 1.2a) (Seymour, 1991). Die wichtigsten meist gramnegativen, anaeroben Mikroorganismen sind *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Tannerella forsythia* (T.f.), *Prevotella intermedia* (P.i.) und

Fusobacterium nucleatum (F.n.). Haffajee et al. und Wolff et al. beschrieben eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl von *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* und der Taschentiefe (Haffajee and Socransky, 2001, Wolff et al., 1993). Die Anwesenheit von *T. forsythia* und *P. gingivalis* in einer parodontalen Tasche steigert das Risiko von anhaltenden parodontalen Knochenverlusten um das 2,5fache (Grossi et al., 1995), Wissenschaftliche Untersuchungen bei Rauchern ergaben zudem ein 2,3fach erhöhtes Risiko an eine *T. forsythia* Infektion zu erkranken (Zambon et al., 1996).



Abb. 1.2 a: Schematische Darstellung des Zusammenwirkens vielfältiger, ätiopathogenetischer Faktoren bei der Pathogenese der Parodontitis. Durch den mikrobiellen Angriff des dentalen Biofilms wird die Entzündungskaskade ausgelöst. Über Virulenzfaktoren wird im Gewebe eine immunentzündliche Antwort hervorgerufen, die durch Umwelt- und erworbene Risikofaktoren sowie durch genetische Einflüsse moduliert wird. Durch verschiedene Entzündungsmoleküle und besonders durch Polymorphkernige Granulozyten (PMNs) resultiert eine parodontale Gewebedestruktion. [Quelle: (Page and Kornman, 1997)]

Page und Schröder (1997) teilten die Progression der Gingivitis und Parodontitis histologisch in vier Stadien ein: initiales, frühes, etabliertes und fortgeschrittenes Stadium.

Die initiale Läsion entwickelt sich nach der Plaqueablagerung innerhalb von zwei bis vier Tagen. Schon in den ersten 24 Stunden macht sich eine erhöhte Permeabilität und Dilatation der Arteriolen, Kapillaren und Venolen des dentogingivalen Plexus bemerkbar.

Der hydrostatische Druck der Mikrozirkulation steigt an und es kommt zu einem erhöhten Flüssigkeitsaustritt aus dem Gingivasulkus, was zu einer ödematösen Entzündung und klinischen Schwellung der Gingiva führt. Die neutrophilen Granulozyten wandern durch das Bindegewebe und sammeln sich im Saumepithel und im Gingivasulkus. Serumproteine treten im Sulkus auf und das perivaskuläre Kollagen wird abgebaut. Diese initiale Läsion ist reversibel (Kinane, 2001).

Die frühe gingivale Läsion (siehe Abb.1.2b) kann innerhalb von 14 Tagen auf dem Boden einer unbeeinflussten initialen Läsion entstehen. Histologisch dominieren Lymphozyten und aktivierte Makrophagen dieses Stadium. Ferner sind einige Plasmazellen vorhanden (Brex et al., 1987). In dieser Läsion finden zytopathische Veränderungen der ortsständigen Fibroblasten statt, die eventuell aus einer Wechselwirkung mit den Lymphozyten resultieren. Es kommt zum Zelltod und zur Entfernung der Fibroblasten aus der erkrankten Region. Der Kollagenverlust liegt in dieser Phase bereits bei ca. 70 %. Auch in diesem Stadium sind die entzündlichen Veränderungen klinisch deutlich zu bemerken. Gegen Ende der zweiten Woche der Plaquebildung können subgingivale Konkremente gefunden werden. Die Dauer dieser frühen Läsionsphase (Abb. 1.2b) kann nicht exakt ermittelt werden, da die Dauer bis zur Entwicklung einer etablierten Läsion durch eine unterschiedliche individuelle Prädisposition bestimmt wird (Kinane, 2001).

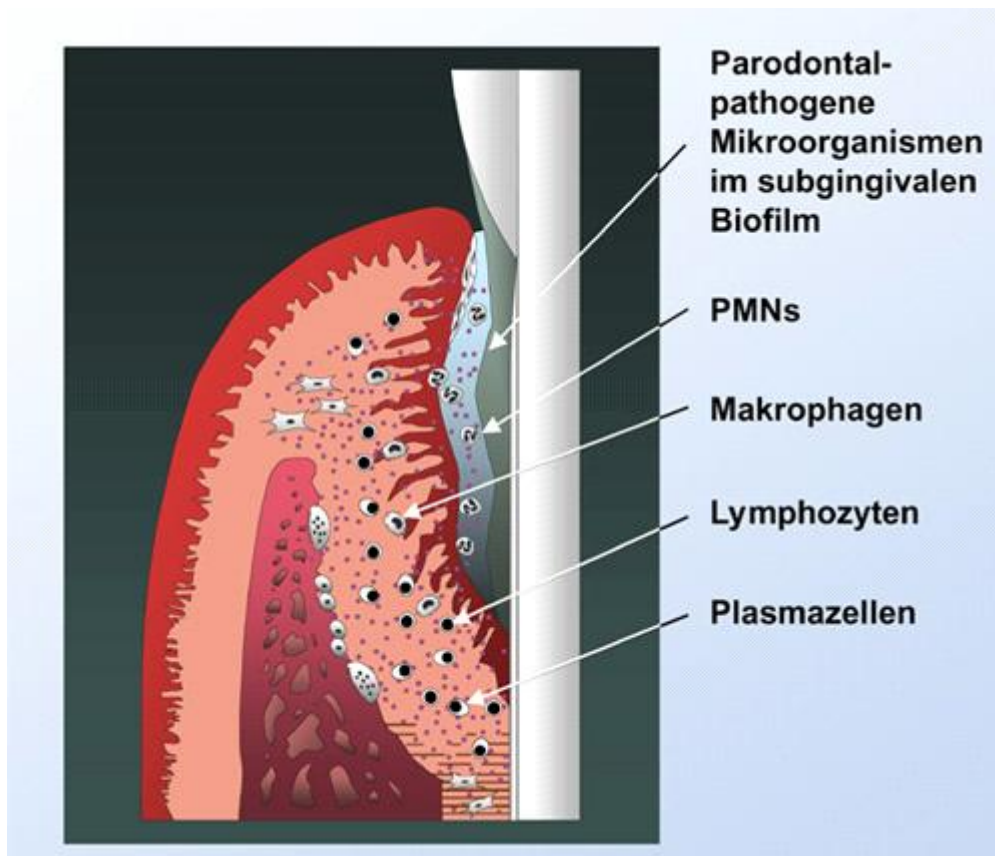


Abb.1.2 b: Darstellung der Destruktion des Parodonts zum Zeitpunkt einer frühen gingivalen Läsion. Histologisch dominieren Lymphozyten und aktivierte Makrophagen dieses Stadium. Ferner sind einige Plasmazellen vorhanden (Brex et al., 1987). In dieser Läsion finden zytopathische Veränderungen der ortsständigen Fibroblasten statt, die eventuell aus einer Wechselwirkung mit den Lymphozyten resultieren. Es kommt zum Zelltod und zur Entfernung der Fibroblasten aus der erkrankten Region. Der Kollagenverlust liegt in dieser Phase bereits bei ca. 70 %. Auch in diesem Stadium sind die entzündlichen Veränderungen klinisch deutlich zu bemerken. [Quelle:(Page and Kornman, 1997)]

Die etablierte Läsion kann sich beim Erwachsenen innerhalb weniger Wochen aus einer frühen Läsion entwickeln und bei guter Mundhygiene noch reversibel sein. Große Mengen von Plasmazellen finden sich primär im koronalen Bindegewebe. Extravaskuläre Immunglobuline treten im Bindegewebe und im Saumeptithel auf. Durch den fortschreitenden Abbau des Kollagens proliferiert das dentogingivale Epithel zunehmend. Klinisch lässt sich eine stärkere ödematöse Schwellung im Vergleich zum frühen Stadium beobachten, die als etablierte Gingivitis bezeichnet werden kann (Seymour et al., 1983). Bei der fortgeschrittenen Läsion zeigt sich ein deutlicher destruktiver Prozess des Parodonts. Die Läsion breitet sich auf das Desmodont und den Alveolarknochen aus. Ein zunehmender Kollagenverlust und die weitere Ausbildung der parodontalen Tasche zeichnen dieses Stadium aus. Eine

ausgedehnte entzündliche und immunologische Gewebereaktion geht damit einher. Klinisch spiegelt das Stadium der fortgeschrittenen Läsion einen destruktiven Prozess wider, der einer etablierten Parodontitis entspricht (Seymour et al., 1983). In diesem Stadium der Erkrankung ist somit lediglich das Ausheilen der Entzündung möglich. Eine vollständige Geweberegeneration im Sinne einer *restitutio ad integrum* kann nicht erreicht werden. Im histologischen Präparat kann die Infiltration des Granulationsgewebes deutlich sichtbar gemacht werden (Abb. 1.2c):

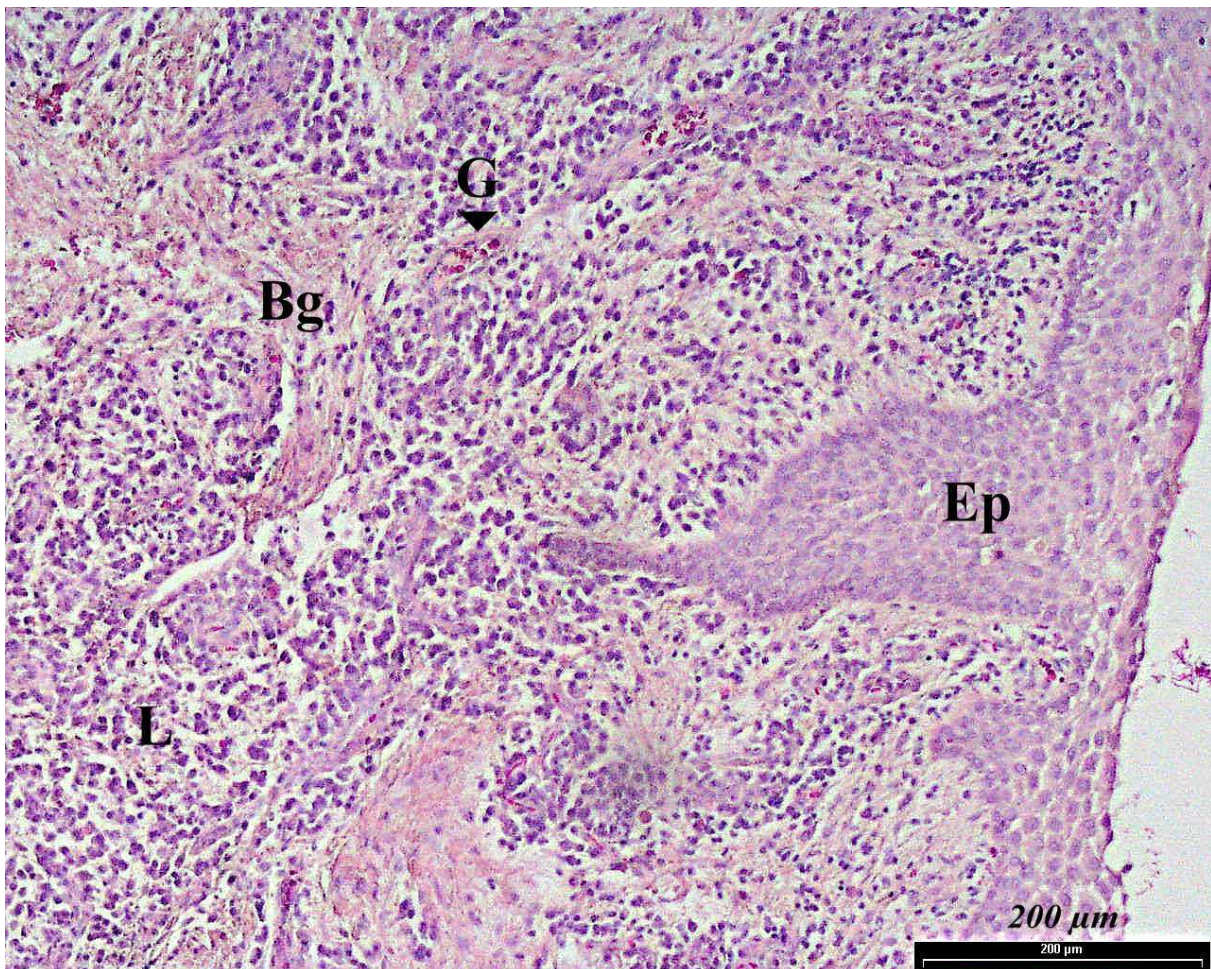


Abb. 1.2c : Biopsie des Granulationsgewebes bei einem Parodontitispatienten mit massiver leukozytärer Infiltration des subepithelialen Bindegewebes

Ep: Epithel, **Bg**: Bindegewebe, **G**: Blutgefäße, **L**: Leukozyten, Quelle: (Bartsch, 2006)

1.2.1 Direkte, mikrobiell bedingte Gewebedestruktion

Bakterielle Enzyme und andere Stoffwechselprodukte und Toxine können auch direkt das parodontale Gewebe angreifen. Die freigesetzten Stoffwechselprodukte, wie Ammoniak, Indol, Schwefelwasserstoff und Buttersäure sind gewebetoxisch (Singer

and Buckner, 1981) und neben den von Bakterien produzierten Hyaluronidasen, Chondroitinsulfatasen, proteolytischen Enzymen im Gewebe nachweisbar (Rateitschak, 2004). Andere Enzyme, wie Peptidasen, degradieren Bestandteile der interzellulären Matrix des Epithels und Bindegewebes (Aduse-Opoku et al., 1995). Im Verlauf der Parodontitis werden inflammatorische und immunologische Prozesse von Seiten des Wirtsorganismus aktiviert, sodass ein Wechselspiel zwischen Bakterienangriff und Wirtsabwehr stattfindet. Diese Abwehrmechanismen lassen sich in unspezifische und spezifische Abwehr einteilen. Molekulare Faktoren die parodontale Entzündungsreaktionen hervorrufen können, sind in nachfolgender Tabelle 1.2.1 dargestellt.

Entzündungsfaktoren	Auslösende Reaktion
Leukotriene	Erhöhung der Gefäßpermeabilität
Histamin	Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Schmerzauslösung
Serotonin	Vasoaktive Arterioldilatation und –konstriktion
Bradykinin	Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Schmerzauslösung
PGE	Vasodilatation, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Schmerzauslösung
PGE ₂	Osteoklastenaktivität
IL-1	Knochenresorption, Osteoklastenaktivität
IL-2	Wachstumsstimulation der T- und B-Lymphozyten
IL-6	Differenzierung und Wachstum von T- und B-Lymphozyten, Osteoklastenbildung
IL-8	Chemotaxis
INF- γ	Immunregulation, Granulozytenaktivierung
TNF- α	Knochendestruktion, Induktion von Akute-Phase-Proteinen
aMMP-8	kollagenolytische Wirkung
PDGF, NGF, EGF, IGF-1, TGF	Knochendestruktion
Immunglobuline (Ig)	Antigen-/Enzymaktivierung, Aktivierung von Komplementsystem, Aggregation von Mikroorganismen, Mastzellaktivierung (IgE)

Tabelle 1.2.1: Auswahl von Faktoren die an der parodontalen Entzündungsreaktion mitwirken. Modifiziert nach (Hellwig, 2003).

1.2.2 Immunologie

1.2.3 Unspezifische und spezifische Abwehr

Beim Fortschreiten einer chronischen Parodontitis vollzieht sich während der Entzündungs- und Immunantwort im Parodontium ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Prostaglandinen, reaktiven Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen (Reynolds and Meikle, 1997, Okada and Murakami, 1998, Hernandez et al., 2007).

Im Sulkus befinden sich sowohl im gesunden Zustand als auch bei Erkrankung vornehmlich die neutophilen polymorphkernigen Leukozyten (PMNs). Sie wandern aufgrund der entzündungsbedingten erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße und der begleitend ansteigenden Sulkusfließrate, sowie durch chemotaktische Stimuli der dentalen Plaque vermehrt vom Blut in das Saumepithel und den Sulkus ein. Die Einwanderung der Leukozyten aus den Gefäßen in den Sulkus wird durch Adhäsionsmoleküle kontrolliert (Moughal et al., 1992). PMNs bilden die erste Verteidigungslinie gegen die parodontalen Pathogene im Gingivasulkus und spielen somit eine zentrale Rolle beim Gewebeabbau der Parodontitis. Sie phagozytieren Bakterien und töten sie mit Hilfe von Enzymen aus ihren Lysosomen ab (Sigusch et al., 2001). Das führt einerseits zu ihrem eigenen Zelltod und gleichzeitig zur Zerstörung der umgebenden Wirtsgewebe durch die Freisetzung lytischer Enzyme.

Es gibt verschiedene Mechanismen des Kollagenabbaus. Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) sind die bedeutendste Gruppe von Proteasen in der extrazellulären Matrix. Sie sind zinkhaltige Enzyme (Endopeptidasen) und sind bei der Parodontitis maßgeblich am Kollagenabbau beteiligt. Wichtige MMPs sind Kollagenasen, Stromalysine, Elastasen und die Gelatinasen.

Speziell die Matrix-Metallo-Proteinase-8, ist durch ihre kollagenolytische Wirkung maßgeblich für die Vermittlung des desmodontalen Kollagenabbaus verantwortlich.

Dieses Enzym wird von polymorphkernigen Leukozyten (PML) aktiviert und sezerniert und kann bei parodontalpathogenen Abbauprozessen vermehrt in der Sulkusflüssigkeit nachgewiesen werden (Kinane et al., 2003).

Die MMP-8 stellt das Schlüsselenzym für die Gewebedestruktion im Rahmen einer Parodontitis dar, löst in ihrer aktiven Form (aMMP-8) fibrilläre Kollagenverbindungen auf und ist zudem in der Lage, alveoläre Knochenstrukturen zu zerstören (Uitto et al., 2003). Sie stellt somit einen Frühmarker für parodontale Gewebedestruktion dar und kann in der Sulkusflüssigkeit ermittelt werden (Prescher et al., 2007). Matrix-Metallo-Proteasen werden hauptsächlich von Fibroblasten, Makrophagen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) produziert. Die von Osteoblasten exprimierten Kollagenasen lösen die Knochenmatrix auf (Romanelli et al., 1999).

Zytokine sind lösliche Proteine, die Informationen zwischen Zellen vermitteln. Hierzu gehören die Interleukine (IL) 1-13, die Tumornekrosefaktoren (TNF), die Interferone (IFN), die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β), der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und PDGF (platelet derived growth factor). Die Zytokine initiieren entzündliche und immunologische Reaktionen und regulieren das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Sie scheinen maßgeblich an der Knochendestruktion beteiligt zu sein. Interleukine spielen bei der Pathogenese der Parodontitis eine entscheidende Rolle, da sie durch ihre resorbierenden Fähigkeiten zum Schwund der Knochenmatrix beitragen (Richards and Rutherford, 1988). IL-1 wird bei einer Parodontitis sowohl im Taschenexsudat (Charon et al., 1982) als auch im parodontalen Gewebe (Jandinski et al., 1991, Stashenko et al., 1991a), vermehrt angetroffen. TNF α und IL-6 beeinflussen die Knochenresorption (Geivellis et al., 1993). IL-6 ist an der Differenzierung und dem Wachstum von T- und B-Lymphozyten beteiligt und fördert die Bildung von Immunglobulinen. IL-8 besitzt eine sehr starke chemotaktische Funktion und aktiviert neutrophile Granulozyten. TNF- α hat ähnliche Eigenschaften wie IL-1. Die Sekretion von Fibroblasten und Monozyten wird von bakteriellen Lipopolysacchariden stimuliert (Rink and Kirchner, 1996). Prostaglandine sind Arachidonsäurederivate, die von Zellen wie z.B. Makrophagen, eosinophilen Granulozyten und Fibroblasten sezerniert werden. Das am stärksten mit der Parodontitis assoziierte Prostaglandin ist das PGE-2. Es wird durch Makrophagen, Fibroblasten und auch durch das IL-1 Signal produziert. PGE-2 wirkt unter anderem die Osteoklasten und vermittelt somit den Knochenabbau. Es wirkt vasodilatierend

und erhöht die Gewebepermeabilität. Die Produktion wird durch Histamin, Serotonin und Bradykinin erhöht. PGE-2 ist bis zu 10-mal höher im entzündeten Parodontalgewebe konzentriert, als im gesunden Gewebe (Offenbacher et al., 1981). Mit zunehmendem Schweregrad der Parodontitis erhöhen sich die freigesetzten Mengen an PGE-2 in der Sulkusflüssigkeit (Albers, 1997). Monozyten wandern zur Bekämpfung der Mikroorganismen in das befallene Gewebe ein und wandeln sich in Makrophagen um. Ihre Hauptaufgaben sind hierbei die Antigenprozessierung beziehungsweise –präsentation, die Aktivierung von T-Lymphozyten, sowie die Phagozytose von Bakterien. Auch die Mastzellen der Gingiva sind am Entzündungsprozess beteiligt, sie setzen Histamin und Serotonin frei, erhöhen weiterhin die Gefäßpermeabilität und fördern somit den Übertritt von Leukozyten ins Gewebe bzw. die Entstehung des Entzündungsinfiltrats. Da nicht alle Antigene von der unspezifischen Abwehr vollständig bekämpft werden können, wird meist zusätzlich das spezifische Immunabwehrsystem aktiviert. Dieses kann in ein humorales und ein zelluläres System unterteilt werden.

Zum *humoralen* System gehören bakterielle Antigene wie das Lipopolysaccharid von *Porphyromonas gingivalis*, welches B-Lymphozyten direkt stimuliert und somit die Produktion spezifischer Immunglobuline (Ig) erhöht. Immunglobuline der IgG-Gruppe spielen im Abwehrmechanismus der chronischen Parodontitis eine entscheidende Rolle. Es werden bei Parodontitispatienten erhöhte IgG Titer im Vergleich zu den gesunden Probanden nachgewiesen (Kinane et al., 1993, Mooney and Kinane, 1994). Das IgG heftet sich an Bakterien und erleichtert deren Phagozytose (Wilson et al., 1995). Es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe durch die Reaktion von IgG und IgM mit Antigenen. Diese neutralisieren durch ihre Agglutination die Antigene (Ebersole, 2003) und können das Komplementsystem aktivieren. Dieses besteht aus ca. 17 miteinander reagierenden Serumproteinen, von denen die wichtigsten als C1-9 und Faktor B und D bekannt sind. Die Aktivierung dieses Kaskadensystems löst eine Kette von Proteininteraktionen aus. Die Auslösung kann über unterschiedliche Wege erfolgen, den sogenannten klassischen, den alternativen oder den MBL-Lektin Weg. Die einzelnen Faktoren werden dabei in Bruchstücke gespalten, die die Gefäßpermeabilität erhöhen können, die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten steuern, die Opsonierung und Phagozytose von Bakterien erleichtern, B-

Lymphozyten aktivieren und die Lyse von gram-negativen Bakterien hervorrufen können. *Porphyromonas gingivalis* kann Komplement *in vitro* und *in vivo* aktivieren (Sundqvist et al., 1985). Die von den verschiedenen Komplementproteinen ausgelösten Entzündungsprozesse können große Unterschiede bezüglich der Schwere der Parodontitiserkrankung aufweisen.

An der *zellulären* Immunantwort bei der chronischen Parodontitis sind T-Helferzellen, T-Suppressor-Zellen und zytotoxische T-Lymphozyten beteiligt. Es kommt zu einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen wie der Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interferon γ (IFN- γ), sowie Interleukin-1, IL-6 und IL-8 aus aktivierten T-Lymphozyten (Marsh, 2003). IL-1 und TNF- α bewirken die Freisetzung von Kollagenasen aus Bindegewebszellen und stimulieren somit die Knochenresorption. Bei fortgeschrittenen Läsionen mit Knochenabbau stellen die Plasmazellen den größten Anteil des infiltrierten Bindegewebes dar (Brecx et al., 1988b).

1.2.4 Epidemiologische Risikofaktoren der Parodontitis

Risikofaktoren im Zusammenhang mit Parodontitis, sind umweltbedingte, verhaltensbedingte oder biologische Faktoren, die durch den zeitlichen Verlauf beeinflusst werden (Sanderink, 2004).

Vorhandensein subgingivaler Plaque-Biofilme mit darin enthaltenen parodontalpathogenen Mikroorganismen, sowie weitgehende Abwesenheit bzw. Unterdrückung kommensaler Keime gelten als Voraussetzung für die Entstehung und Etablierung einer Parodontitis. Im Folgenden werden diese Faktoren näher betrachtet:

Nikotinabusus (Salvi et al., 1997, Hyman and Reid, 2003), wird als entscheidender Risikofaktor für die Parodontitisentwicklung und den Verlauf angesehen. Rauchen greift in die lokalen Abwehrmechanismen des Wirtes vielfältig ein. Es besteht dabei ein ca. fünffach erhöhtes Risiko eine Parodontitis zu unterhalten. Prävalenz, Schweregrad und die Progression der Parodontitis sind laut zahlreicher Studien mit *Diabetes mellitus* assoziiert. Vor allem bei Patienten mit schlecht eingestellten Blut-

Glukose-Spiegel. (Salvi et al., 2008, Southerland et al., 2006). Insulinabhängiger Diabetes (Typ-1) ist mit genetischen Störungen und Immunsystemdefekten verbunden. Dadurch besteht eine höhere Anfälligkeit für Infektionen, wie zum Beispiel auch für Parodontitis. Auch der Typ-2 Diabetes, der in der Regel erst nach dem 35. Lebensjahr auftritt, birgt trotz fehlender Autoimmunfaktoren ein Parodontitisrisiko (Moore et al., 2004). Weitere Risikofaktoren die in Zusammenhang mit einer Parodontitis gebracht werden können, sind unter anderem *Bluterkrankungen*. Beispielsweise kommt es bei Leukämie durch die Reifungsstörungen der Leukozyten zu Verdrängung normaler Blutzellen. Als Folge lassen sich Anämie, erhöhte Blutungsneigung auf Grund der Thrombozytopenie und gesteigerte Infektionsgefahr bedingt durch die entstandene Abwehrschwäche beobachten (Kirch, 1994). Auch *HIV-Infektion und die AIDS-Manifestation* stellen ein erhöhtes Risiko dar, parodontale Erkrankungen zu entwickeln (Alpagot et al., 2004). Auch *genetische Erkrankungen*, wie zum Beispiel das Down-, ChediakHigashi- und Papillon Levevre-Syndrom steigern die Gefahr eine Parodontitis zu entwickeln (Deas et al., 2003). Patienten die an *Osteoporose* leiden, weisen im Vergleich zu Personen ohne Osteoporose einen klinisch höheren Attachment-Verlust auf (Salvi et al., 1997, Inagaki et al., 2007, Baldi et al., 2009). Die Assoziation zwischen Osteoporose und Parodontitis konnte durch mehrere Studien bestätigt werden (Krall, 2001, Wactawski-Wende, 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass Calciumpräparate, Vitamin D-Gaben und Östrogensubstitution eine Verringerung von Knochen- und Zahnverlust zur Folge haben (Krall, 2001). Desweiteren haben *Behandlungen mit immunsuppressiven Medikamenten*, *genetische Besonderheiten im Rahmen der (parodontalen) Immunantwort* (Page, 1999), *ethnische und sozioökonomische Zugehörigkeiten* (Page, 1998), sowie *Persönlichkeitsmerkmale* (z.B. Stressverhalten, Motivationsfähigkeit) und *Ernährungsgewohnheiten* (z.B. Zuckerkonsum) negative Auswirkungen auf die parodontale Gesundheit. Auch *mechanische Reinigungshindernisse*, wie zum Beispiel Zahnschief- oder Zahnengstände, Zahnstein, Prothesenklammern, überstehende Kronenränder und festsitzende kieferorthopädische Apparaturen können das Risiko eine Parodontitis zu entwickeln erhöhen. Letztlich kann auch *emotionaler Stress* über eine Schwächung des Immunsystems Einfluss auf den Verlauf einer Parodontitis haben (Van Dyke and

Sheilesh, 2005). In einer Fallkontrollstudie konnte gezeigt werden, dass sowohl allgemeine negative Ereignisse im Alltag eines Menschen, als auch Arbeitslosigkeit mit Parodontitis in Zusammenhang gebracht werden können (Croucher et al., 1997).

1.3 Genetik der Parodontitiden

Hippokrates, der Urvater der europäischen Medizin, erkannte bereits vor 2400 Jahren, dass manche Krankheiten erblich sind: „Zu auffällig war deren gehäuftes Auftreten in einzelnen Familien.“

Heute ist bekannt, dass nahezu jede Erkrankung auch einen genetischen Hintergrund hat. Genetische Studien zu Parodontalerkrankungen deuten darauf hin, dass Geschlecht und ethnische Herkunft die individuelle Anfälligkeit für die Erkrankung beeinflussen (Marsh, 2003). Es wurden auch die subgingivalen Mikroflora von Zwillingen untersucht. Die Mikroflora von den Zwillingsgeschwistern, die zusammenlebten, glichen sich mehr als die von nicht miteinander verwandten Kindern selben Alters. In anderen Studien wurde gezeigt, dass die Mikroflora von eineiigen Zwillingen ähnlicher war als die von zweieiigen, was auf eine mögliche genetische Kontrolle hindeutet (Marsh, 2003, Mucci et al., 2005).

1.3.1 Genetische Polymorphismen (Single Nucleotid Polymorphismen)

Jeder Mensch mit Ausnahme von eineiigen Zwillingen verfügt über eine einmalige Variation des menschlichen Genoms. Für viele Genloci existieren in der Population unterschiedliche Varianten (Allele). Die Häufigkeit eines bestimmten Allels an einem Genort innerhalb einer Population wird als Allelfrequenz oder Genfrequenz bezeichnet (Murken, 2006). Es werden für jedes individuelle Genom nicht nur die Genkombinationen der Parentalgeneration zu jeweils 50% wiederholt, sondern es

entsteht durch „*crossing-over*“ und Rekombination in der Zellteilung eine große Vielzahl von neuen Genkombinationen. Sogenannte single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) sind unterschiedliche Nukleotidsequenzen in einem Genabschnitt, ohne einen eindeutig zuzuordnenden Phänotyp bzw. Erkrankung. Definitionsgemäß versteht man darunter das Vorhandensein von zwei oder mehr Allelen eines Gens in einer Population. Dass die Auftretenswahrscheinlichkeit der Genvariation größer als 1% sein muss, da es sich sonst um eine Mutation handelt (Knippers, 2006, Passarge, 2004), ist nach Einführung modernster molekulargenetischer Methoden inzwischen überholt. In der Gesamtpopulation konnten sich Polymorphismen durchsetzen, da sie für ihre Träger keine deletären Konsequenzen bedeuteten. Die meisten Menschen besitzen demnach Gene, die sie in erster Linie weitgehend gesund erhalten, die aber durch entsprechende Umwelteinflüsse (wie z.B. Rauchen) zu Krankheiten prädisponieren können. Der Mensch besitzt ungefähr 20000-25000 Gene und von einigen kennt man bereits ca. 50-80 Polymorphismen pro Gen (IHGS-Consortium, 2004). Diese Single Nucleotid Polymorphismen treten durchschnittlich alle 100-200 Basenpaare auf. Derzeit sind fast 18 Millionen SNPs katalogisiert (dbSNP, 2009).

Das nachfolgende Beispiel (Abb. 1.3.1) zeigt, dass der Ersatz eines Cytidins (C) gegen Guanin (G) im Gen zu einer Aminosäure mit völlig anderen Eigenschaften führt: Gebildet wird das kleine, neutrale Glycin (Gly) statt des großen, basischen Glutamins (Gln).

	Unverändert	SNP
Gen	AAG-CGA-ATT-AGG → AAG - GGA - ATT - AGG	
Protein	Lys -Gln -Ile -Arg → Lys - Gly - Ile -Arg	

Abb.1.3.1: Darstellung der Auswirkung auf die Aminosäure beim Austausch eines Cytidins (C) gegen Guanin (G) im Gen, Quelle: (www.roche.com/pages/facetten/22/snps_d.pdf)

Je nach Lage eines solchen Austausches im Erbgut, kann er sehr unterschiedliche Auswirkungen haben. Deshalb werden die SNPs nach dem Ort ihres Vorkommens in vier Gruppen eingeteilt (siehe Abb1.3.1 b):

1. *rSNPs* (random SNPs) **grüne Pfeile**:

Die Mehrzahl der SNPs befindet sich in den so genannten stillen Bereichen des menschlichen Genoms und haben in aller Regel keine Auswirkungen auf den Phänotyp. Sie dienen in erster Linie als Marker bei der Kartierung des Genoms.

2. *gSNPs* (Gen-assoziierte SNPs) **gelbe Pfeile**: Einige SNPs liegen in unmittelbarer Nachbarschaft von Genen bzw. in den Introns. Das sind die Bereiche eines Gens, die nicht in ein Genprodukt übersetzt werden. Meistens werden sie mit diesen Genen zusammen vererbt, was sie für deren Kartierung wichtig macht. *gSNPs* können außerdem wichtige Kontrollelemente des Gens dahingehend beeinflussen, dass das Ablesen eines Gens behindert oder beschleunigt wird.

3. *cSNPs* (codierende SNPs) **blaue Pfeile**: SNPs die im Bereich eines Exons liegen haben oft einen großen Einfluss auf die Funktion des entsprechenden Genproduktes. Exons bilden den sogenannten codierenden Bereich, das heißt den in ein Genprodukt übersetzten Abschnitt des Gens.

4. *pSNPs* (Phänotyp-relevante SNPs) **rote Pfeile**: Wie oben bereits erwähnt können sowohl *gSNPs* als auch *cSNPs* den Phänotyp eines Menschen beeinflussen. Die *pSNPs* stellen für die Medizin die wichtigsten Variationen dar, da sie Einfluss auf biologische Funktionen des Organismus haben.

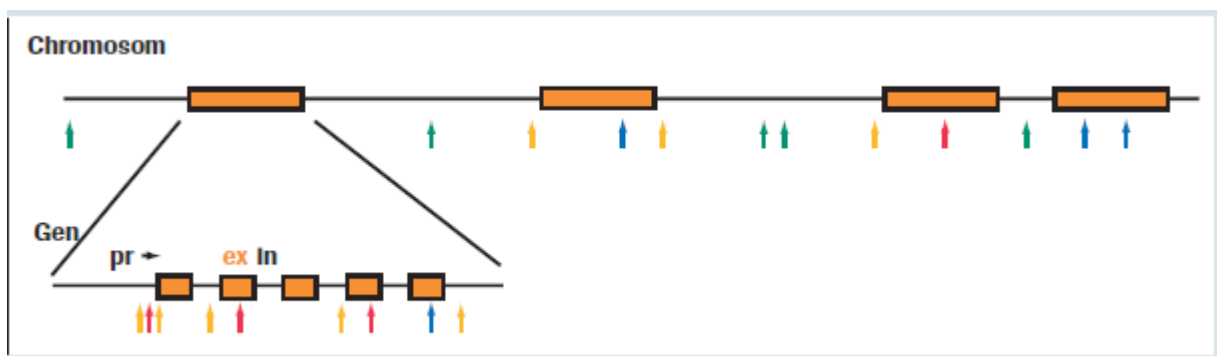


Abb. 1.3.1 b: SNP-Gruppen

Quelle: (Hoffmann, 2007), (www.roche.com/pages/facetten/22/snps_d.pdf)

Die Verteilung der Gene auf den Chromosomen ist unterschiedlich. Es gibt einen Promotorbereich (*pr*), in dem sich die Kontrollelemente des Gens befinden. Außerdem existieren so genannte Exons (*ex*), die in das zugehörige Genprodukt übersetzt werden und Introns (*in*), die nicht übersetzt werden. SNPs kommen in allen Abschnitten des Genoms vor.

1.3.2 Kopplungs- und Assoziationsanalysen

Zum Auffinden krankheitsverursachender Gene werden in genetischen Studien sogenannte Marker eingesetzt. Marker sind Polymorphismen im Genom, die nicht zwingend kausal sind für eine Erkrankung, sich aber in sehr großer Nachbarschaft zu einer ursächlichen Gen-Mutation befinden. Diese genetischen Einflüsse können auf die phänotypische Ausprägung, wie auch zum Beispiel auf die Veranlagung eine Parodontitis zu entwickeln, nur durch Varianten einzelner Gene hervorgerufen werden. Die wichtigsten Marker für genetische Untersuchungen sind Mikro-beziehungsweise Minisatellitenpolymorphismen (variable number tandem repeat, VNTR), sowie die Kopienzahlvariationen (copy number variant, CNV) und Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) (Folwaczny, 2012a). Mit diesen Markern kann fast jeder Abschnitt einer sequenzierten DNA markiert werden (Passarge, 2004).

Kopplungsanalysen dienen zum Auffinden chromosomaler Regionen, in denen sich eventuell interessante Gene für eine Erkrankung finden. Dieser Vorgang wird Positionsklonierung („*positional cloning*“) genannt. Es wird der Umstand genutzt, dass das gesuchte Gen in der Nähe eines der untersuchten Markers liegt, und ein Allel dieses Markers mit dem mutierten Gen zusammen vererbt wird (Bickeböller, 2007). Eine Kopplungsanalyse kann genomweit durchgeführt werden und ermöglicht prinzipiell die Suche nach allen ätiologisch relevanten Genregionen. Wurde eine solche mit der Erkrankung in Zusammenhang stehende Region gefunden, wird dieser Bereich näher typisiert bzw. sequenziert, um den infrage kommenden genetischen Abschnitt weiter einzugrenzen (Feinkartierung, *finemapping*). Im

nächsten Schritt werden Gene, die innerhalb des mit der Erkrankung gekoppelten Bereiches liegen, auf potentiell krankheitsrelevante Veränderungen untersucht. Seit 1990 wurden auf diese Weise, die ursächlichen Gendefekte einer Vielzahl von Krankheiten identifiziert.

In genetischen Assoziationsanalysen sollen statistische Zusammenhänge von genetischen Polymorphismen und qualitativen oder quantitativen Merkmalen gefunden werden. Zum Beispiel vergleicht man bei Patientengruppen und Kontrollindividuen die Genotypenhäufigkeit an einem Markerlocus. Für Assoziationsanalysen gibt es verschiedene Studienansätze:

In einem *engen* Kandidatenansatz betrachtet man nur wenige Gene und Marker. Die beobachteten Gene befinden sich in einer kleinen Region des Genoms, welche zuvor durch verschiedene Screeningmethoden eingegrenzt wurden. Bei der Kopplungsanalyse muss eine möglichst eindeutige Verbindung, durch funktionelle Tests zur untersuchten Erkrankung gegeben sein. Dieser Ansatz dient zur Identifizierung des krankheitsverursachenden Gens bei monogenen Erkrankungen. Von einer sogenannten „direkten Assoziationsstudie“ spricht man, wenn ein Vergleich der Häufigkeit von Varianten an einem Genort (SNP, VNTR, CNV) bei erkrankten und gesunden Personen vorgenommen wurde (Folwaczny, 2012a).

In einem *erweiterten* Kandidatenansatz prüft man möglichst viele Gene, die z.B. mit der Pathophysiologie und dem Stoffwechselweg der zu untersuchenden Erkrankung in Verbindung gebracht werden könnten. Außerdem macht es Sinn, Marker in flankierenden, regulatorischen Bereichen dieser Kandidatengene zu untersuchen. Neben dem Kandidatengenansatz werden im *genomweiten* Ansatz sehr viele, über das ganze Genom verteilte representative Marker auf ihren Zusammenhang, im wörtlichen Sinne, mit der zu untersuchenden Krankheit genotypisiert. Genomweite Assoziationsstudien (GWA), die auch als „indirekte Assoziationsstudien“ bezeichnet werden, sind insbesondere durch die technische Entwicklung von Hochdurchsatzgenotypisierungsverfahren inzwischen möglich geworden (Bickeböller, 2007).

1.3.3 Einfluss von SNPs auf die Pathogenese der Parodontitis

Die Forschung nach Zusammenhängen zwischen genetischen Aspekten und dem parodontologischem Erkrankungsrisiko hat, wie sich in der Literatur widerspiegelt, deutlich zugenommen. Insbesondere die an der Pathogenese beteiligten Mechanismen scheinen hier interessant zu sein. Dabei konzentrierte sich die genetische Parodontitis-Forschung vor allem auf Zytokine, Immunrezeptoren, das HLA System, verschiedene Strukturproteine und metabolische Enzyme (Yoshie et al., 2007, Takashiba and Naruishi, 2006). Ein möglicher Einfluss auf das Erkrankungsrisiko durch SNPs vermuteten Kornman et al. schon 1997 in Genen für proinflammatorische Zytokine. Bei der Untersuchung der SNPs in den Genen für IL-1 α bzw. IL-1 β wurden Korrelationen mit einem besonders schweren Verlauf der Parodontitis bei Rauchern festgestellt. Außerdem zeigte sich, dass Individuen mit positivem IL-1 β -Genotyp eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, eine schwere parodontale Erkrankung im Alter von ≥ 40 Jahren zu entwickeln, als Individuen mit negativem Genotyp (Kornman et al., 1997). Kornman et al. konnte zudem zeigen, dass Patienten mit diesen Polymorphismen häufiger und ausgeprägter eine Parodontitis entwickeln als Kontrollindividuen ohne diese SNPs. Das Risiko des Zahnverlustes ist in der genotypisch auffälligen Population 2,7-mal höher. Raucher mit einem positiven IL1- Genotyp hatten sogar 7,7 fach höhere Zahnverluste zu verzeichnen als die gesunden Probanden (Kornman et al., 1997). Einige nachfolgende Studien zu genetischen Aspekten der Parodontitis bestätigten diese Ergebnisse teilweise (Cullinan et al., 2001, Parkhill et al., 2000, Socransky et al., 2000), andere jedoch widerlegten sie zum Teil (Hodge et al., 2001, Meisel et al., 2003, Papapanou et al., 2001, Borrell and Papapanou, 2005, Kinane and Hart, 2003). 2002 wurde die erste Metaanalyse zu IL-1 α bzw. IL-1 β publiziert, worin die Autoren Greenstein, G. und Hart, T.C. unter anderem schrieben, dass viele unbeantwortete Fragen bezüglich dem Nutzen der entdeckten Allele 2 in „IL-1A+4845 and IL-1B+3954“-Loci offenbleiben und somit eine Vorhersage kritisch bleibt, welche Patienten an chronischer Parodontitis erkranken (Greenstein and Hart, 2002). Andere kritische Äußerungen zu dieser Thematik wurden sowohl von Shapira et al. in einem Review veröffentlicht, als auch von Loos et al. und Huynh-Ba et al.

(Loos et al., 2005, Huynh-Ba et al., 2007, Shapira et al., 2005). Während parodontopathogene Mikroorganismen und andere Umwelteinflüsse die Parodontitisentstehung initiieren und modulieren, sind unterschiedliche Reaktionen der Betroffenen auf diese umweltbedingten Herausforderungen bekannt (Kinane et al., 2005). Diese Unterschiede lassen sich durch das individuelle genetische Profil der Patienten mit Parodontitis begründen. *Kinane et al.* kam zu dem Schluss, dass sich der IL-1 Polymorphismus zwar auf die chronische Form der Parodontitis auszuwirken scheint, der Einfluss jedoch nicht sicher einzuschätzen ist und somit eine Anwendung im klinischen Umfeld derzeit unmöglich erscheint (Kinane and Hart, 2003). Andere Autoren haben für zwei Polymorphismen im IL-1-Gen die funktionelle Bedeutung belegt. Ein SNP befindet sich an Position -889 in der Promoterregion des IL1A-Gens (C/T), der zweite liegt an der Stelle -3953 (C/T) des IL1B-Gens. Es kommt zu einer gesteigerten IL1-Synthese und somit zu einer erhöhten Entzündungskapazität, wenn bei beiden Polymorphismen das T-Allel vorliegt (Moreira et al., 2007a). Bei Trägern der IL1-Polymorphismen im Rahmen einer Parodontitis konnten zudem höhere IL1-Spiegel in der gingivalen Saumflüssigkeit nachgewiesen werden, als bei Nicht-Trägern (Shirodaria et al., 2000).

Auf Grund der herausragenden Bedeutung von inflammatorischen Zytokinen (IL1 α , IL1 β und TNF α) für die individuelle Entzündungsneigung, wurden zahlreiche Kandidatengenstudien vorgenommen. Es zeigte sich, dass ein G/A-Polymorphismus an der Stelle -308 im Promoter des Gens mit einer bis zu siebenfach höheren TNF α -Gen-Expression einhergeht (Galbraith et al., 1998, Nikolopoulos et al., 2008). *Galbraith et al.* konnte auch bei Patienten mit Therapie-resistenter Parodontitis und Trägern des A-Allels im TNF α -Gen eine vermehrte TNF α - Freisetzung durch orale Schleimhautleukozyten nachweisen. Zudem konnten positive Assoziationen mit der chronischen Parodontitis und TNF α (Soga et al., 2003) und Fc- γ auf Immunzellen nachgewiesen werden (Kinane et al., 2005).

Neben TNF α und IL-1 spielen bei der initialen Entzündungsantwort auch andere Zytokine in der Modulation der Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-6 zum Beispiel wird von Makrophagen, Fibroblasten, Epithelzellen und T-Zellen sezerniert und steigert die MMP-8-Freisetzung (Nibali et al., 2008). *Moreira et al.* erkannte, dass eine erhöhte IL-6-

Expression in Zusammenhang mit chronischer Parodontitis steht und mit dem klinischen Attachmentverlust korreliert (Moreira et al., 2007b).

Auch IL-10 stellt ein antiinflammatorisches Zytokin dar und wird im Zuge der Entzündungsreaktion zeitversetzt von Makrophagen und T-Zellen sezerniert. In einer Studie von *Claudino et al.* konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus C-592A mit der Progression der Parodontitis assoziiert ist. Das A-Allel geht mit einer verminderten IL-10-Synthese einher und kommt signifikant gehäuft bei Parodontitispatienten vor (Claudino et al., 2008).

Im Hinblick auf die Beobachtung, wonach Vitamin-D eine entscheidende Rolle im Knochenstoffwechsel, in der Immunantwort und im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel spielt, wurden verschiedene Polymorphismen im Vitamin-D-Rezeptor-Gen auf eine Assoziation mit der chronischen Parodontitis untersucht. *Tachi et al.* konnte im Zuge dessen einen T/C-Polymorphismus vermehrt bei Patienten mit chronischer Parodontitis nachweisen (Tachi et al., 2003).

Aufgrund der teilweise sehr widersprüchlichen Ergebnisse dieser direkten Assoziationsstudien wird deutlich, dass das Parodontitisrisiko wahrscheinlich polygenetisch vererbt wird und somit die Polymorphismen von einzelnen Genen nur einen von vielen verschiedenen Faktoren darstellen.

1.4 Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1)

Deleted in Malignant Brain Tumors 1 (DMBT1) ist ein Glykoprotein, das von mucosalen Epithelien, Drüsen und Immunzellen exprimiert wird. Es gehört der archaischen *scavenger receptor cysteine-rich* (SRCR) Familie an. (Mollenhauer et al., 1999, Mollenhauer et al., 1997). Es wird als potenzieller Tumorsuppressor diskutiert (Mollenhauer et al., 2000, Mollenhauer et al., 2001, Mollenhauer et al., 2002a, Mollenhauer et al., 2003, Mori et al., 1999), und reguliert als extrazelluläres Matrix-Protein Differenzierungsprozesse in Epithel- und Stammzellen. Es bindet als lumenal sezerniertes Protein ein breites Spektrum von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und Pathogenen, wie z.B. *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, Streptokokken und Salmonellen sowie HI-Virus und Influenza A-Viren (Bikker

et al., 2002). Aufgrund dieser pathogenbindenden Eigenschaften wird vermutet, dass DMBT1 eine Funktion in der Pathogenabwehr als Komponente angeborener Verteidigungsmechanismen hat, die nicht nur für Infektionserkrankungen, sondern auch für die infektionsbedingte Tumorentstehung von Bedeutung sein könnte. Dennoch existiert bis heute nur ein lückenhaftes Wissen darüber, wie die Pathogenerkennung und Effektorfunktionen von DMBT1 bei der Pathogenabwehr funktionieren. Es ist unklar, ob DMBT1 Bakterien bindet oder die Bakterieneinwanderung verhindert, bzw. eine Anheftung von Bakterien an biologische Oberflächen veranlasst (Carlen and Olsson, 1995, Carlen et al., 1996, Rundegren and Ericson, 1981, Ericson and Rundegren, 1983).

Es wurde postuliert, dass die Proteine *salivary agglutinin* (SAG) und *Glykoprotein-340* (gp-340) verschiedene alternative Splicing-Formen von DMBT1 sind (Tino and Wright, 1999, Prakobphol et al., 2000, Ligtenberg et al., 2001). Sie besitzen die gleiche Aminosäuresequenz und befinden sich auf dem menschlichen Chromosom 10q26.13 (Mollenhauer et al., 1997, Holmskov et al., 1999).

Das *salivary agglutinin* wurde erstmals 1981 von Rundegren und Ericson aus der Parotispeicheldrüse isoliert (Rundegren and Ericson, 1981). Das SAG ist ein 300-400 kDa großes Glycoprotein, das wegen seiner *Streptococcus mutans* bindenden Eigenschaften in der zahnärztlichen Kariologie eine gewisse Bedeutung erlangt hat (Carlen et al., 1998). Neben seinen antikariogenen bakterienhemmenden Eigenschaften, agglutiniert SAG auch körpereigene Proteine, wie IgA, C1q, Laktoferrin und Lysozym (Rundegren and Arnold, 1987, Boackle et al., 1993, Mitoma et al., 2001, Ligtenberg et al., 2004, End et al., 2005, Rundegren, 1986). Das gp-340 Protein wurde 1997 aus dem bronchoalveolärem Lungensekret von Patienten mit alveolärer Proteinose isoliert und ebenso wie das SAG mit der Fähigkeit in Verbindung gebracht, das Surfactant-Protein D und -A zu binden und somit eine wichtige Rolle in der angeborenen Abwehr zu erfüllen (Holmskov et al., 1997, Tino and Wright, 1999). Neben dem Auftreten von DMBT1 in Gehirntumorvarianten, konnte es auch in diversen anderen epithelialen Tumoren beobachtet werden, u.a. in Tumoren der Lunge, des Magens, des Ösophagus, des Colons, der Mamma und der Haut (Wu et al., 1999, Blackburn et al., 2007).

DMBT1 fiel zunächst durch seine Abwesenheit auf. Bei 84% aller untersuchten Tumoren, die von Epithelzellen ausgingen, war die Erbinformation vollständig oder zumindestens teilweise verloren gegangen (Braidotti et al., 2004, Mollenhauer et al., 2002a, Mollenhauer et al., 2002b, Mollenhauer et al., 2002c, Mollenhauer et al., 2003, Mollenhauer et al., 2004, Mollenhauer et al., 1999, Mollenhauer et al., 2000, Mollenhauer et al., 2001).

Auch bei der Infektabwehr, also bei der Agglutination und Bindung von Proteinen, Viren und Bakterien belegen zahlreiche Studien eine wichtige Rolle von DMBT1.

Das DMBT1/SAG/gp-340 wird entweder als membran-gebundenes Protein auf der Oberfläche von alveolären Makrophagen und auf der apikalen Membran von Epithelzellen exprimiert, oder über Körperflüssigkeiten, wie z.B. Speichel, Sputum oder Tränen ausgeschieden (Schulz et al., 2002, Cummins et al., 2006). Hauptsyntheseorte sind vor allem der Darm, der Magen, die Lunge und die Speicheldrüsen. Daneben werden kleinere Mengen im Gehirn, in den Hoden, im Uterus, in der Mamma, in der Prostata und im Pankreas produziert. Abhängig von dem Gewebe und dem Entwicklungsgrad werden unterschiedliche Varianten des DMBT1 exprimiert.

1.4.1 Die Struktur des DMBT1 Gens

DMBT1/SAG/gp-340 sind Mitglieder der *scavenger receptor cystine-rich* (SRCR) Superfamilie und sind durch ihren Aufbau in SRCR Domänen charakterisiert. Das 300-400 kDa schwere Glykoprotein besteht aus (siehe Abb.1.4.1) 13 ca. 3-4kb langen hoch homologen tandemförmig aneinandergereihten SRCR Domänen (Mollenhauer et al., 1997, Mollenhauer et al., 2000). Diese werden durch elf *SID*s (*SID-interspersed domains*) und zwei CUB Domänen unterteilt (Bork and Beckmann, 1993, Romero et al., 1997).

Die CUB Domänen werden wiederum von einer 14-ten SRCR Domäne und einer ZP (zona pellucida) Domäne separiert (Sinowatz et al., 2001).

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mögliche Assoziationen zwischen den Polymorphismen rs2981745, rs2981778, rs11523871, rs3013236, rs2981804, rs2277244 und rs1052715 des humanen DMBT1 Gens, bei Patienten mit der chronischen Parodontitis zu untersuchen. Die Allel- und Genotypfrequenz dieser Polymorphismen bei Patienten mit chronischer Parodontitis, wurden hierfür mit einer Gruppe aus gesunden, unverwandten Kontrollpersonen verglichen. Desweiteren sollte ermittelt werden, ob bestimmte Haplotypen und Kombinationen der getesteten Polymorphismen Assoziationen mit dem Krankheitsbild der CP zeigen und ob sich die sieben ausgewählten SNPs im Kopplungsungleichgewicht befinden. Die Assoziationen der getesteten Polymorphismen wurden nicht nur in den Gesamtpopulationen untersucht, sondern auch in Untergruppen, die auf der Basis von Risikofaktoren (Rauchen, Geschlecht) gebildet wurden.

3 Material

3.1 Studienpopulation

Die Studienpopulationen bestanden aus erwachsenen Individuen mit kaukasisch genetischem Hintergrund. Um die genetische Homogenität der Studienpopulation zu verbessern, mussten die Eltern und Großeltern aller teilnehmenden Individuen ebenfalls in Deutschland geboren worden sein.

Die Diagnose der Parodontitis basierte auf einer standardisierten parodontalen Untersuchung, die folgende Punkte umfasste: (1) Die Anzahl der noch vorhandenen Zähne, (2) die Sondierungstiefe, das Vorhandensein einer Blutung nach der Sondierung, (3) den Grad der Furkationsbeteiligung und (4) den horizontalen Knochenabbau.

Die Sondierungstiefe wurde definiert als der Abstand zwischen dem freien Zahnfleischrand und dem Boden der parodontalen Tasche, bei Messung mit einer Michigan-Sonde Typ „0“, parallel zur Längsachse und an jeweils sechs Stellen des Zahnes (mesio-bukkal, mitte-bukkal, disto-bukkal, mesio-lingual, mitte-lingual, disto-lingual). Zur Prüfung von Furkationsdefekten wurde mit einer Sonde nach *Nabers* horizontal vom Furkationseingang bis zur Basis des Defektes gemessen. Der horizontale Knochenabbau wurde anhand von Röntgenaufnahmen bewertet. Die Studie entsprach den ethischen Richtlinien der Helsinki-Deklaration und wurde von der Ethikkommission der Universität München genehmigt (No 290/01). Alle Teilnehmer gaben vor ihrer Aufnahme in die Studie eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

3.1.1 Patientengruppe

Das Patientenkollektiv umfasste 388 Patienten mit chronischer Parodontitis. Die an der Studie beteiligten Patienten mussten dazu folgende Kriterien erfüllen: (1) Sie besaßen insgesamt mindestens 15 Zähne in situ, (2) 8 Zähne mit

Taschensondierungstiefe von $\geq 5\text{mm}$ an mindestens einer Stelle (3) und / oder eine Furkationsbeteiligung von Grad II oder mehr, (4) radiologischer Knochenverlust von mindestens 3mm um die betroffenen Zähne, gemessen als Distanz zwischen der Schmelz-Zement-Grenze und dem crestalen Rand der Alveole.

3.1.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 762 nicht verwandte, genetisch zur Patientengruppe passende Individuen mit kaukasischer Abstammung ohne chronische Parodontitis.

Die Abwesenheit einer chronischen Parodontitis wurde entsprechend folgender Kriterien festgestellt: (1) mindestens 22 Zähne in situ, (2) maximal eine Stelle mit einer Sondierungstiefe von $\geq 3\text{mm}$, (3) kein klinisch sichtbarer Attachment-Verlust (d.h. Rezession) und (4) keine Furkationsbeteiligung.

Keine Person aus der Kontrollgruppe war in der Vergangenheit an Parodontitis erkrankt oder hatte einen Zahnverlust aus Gründen pathogener Zahnbeweglichkeit.

	Parodontitisfälle (chron. Parodontitis)	Kontrollpersonen
Anzahl	388	762
Frauen	204 (52,6%)	249 (32,7%)
Männer	184 (47,4%)	513 (67,3%)
Raucher	116 (29,9%)	95 (12,5%)
Nichtraucher	252 (64,9%)	666 (87,4%)
Keine Angaben zum Rauchverhalten	20 (5,2%)	1 (0,1%)
Altersmittel* (Jahre)	52,4 ($\pm 14,5$)	47,1 ($\pm 9,8$)
Altersspanne (Jahre)	18-84	35-68

Tabelle 3.1.2: Datenübersicht der untersuchten Personen (*mit Standardabweichung)

3.2 Polymorphismen

In dieser Studie wurden insgesamt sieben Polymorphismen im DMBT1 Gen untersucht:

- rs2981745
- rs301323
- rs1052715
- rs2981778
- rs11523871
- rs2981804
- rs2277244

3.2.1 PCR-Primer

Alle in dieser Studie verwendeten Primer wurden von TIB Molbiol, Berlin, Deutschland synthetisiert. Die Primersequenzen sind in der Abb.3.2.2 (Charakteristika der verwendeten PCR-Primer) aufgelistet.

DMBT1	Primersequenz	Referenz
rs2981745_S forward	5'-CAATTGAATAGAAAATCCTGGACATT-3'	TIB Molbiol, Berlin
rs2981745_R reverse	5'-TTTCCACATATTAGCCATCGAC-3'	TIB Molbiol, Berlin

rs2981778_F forward	5'-CCCTTGACTTGCATCCCTAC -3'	TIB Molbiol, Berlin
rs2981778_A reverse	5'-GGTTCTCCAGGGGGGAAA -3'	TIB Molbiol, Berlin

rs11523871_R reverse	5'-GAATGCCAGAGTTGCTAGAAGTATG -3'	TIB Molbiol, Berlin
rs11523871_S ₂ forward	5'-CAATGAGCTCTTCCTTTTCCAC -3'	TIB Molbiol, Berlin

rs3013236_S forward	5'-CCCAAACAAGGGCTACCATCAAT -3'	TIB Molbiol, Berlin
rs3013236_R reverse	5'- CCAGCACCTACCTTCTATGCC -3'	TIB Molbiol, Berlin

rs2981804_F forward	5'-TGATGCCCATGAGCTGAA-3'	TIB Molbiol, Berlin
rs2981804_R reverse	5'-AGCTGTGCTCATCCGTG-3'	TIB Molbiol, Berlin

rs2277244_A ₂ reverse	5'-ACACCAATGATGCCAATG -3'	TIB Molbiol, Berlin
rs2277244_S forward	5'-TGAGTGAGGAGATCAGAATGTAA-3'	TIB Molbiol, Berlin

rs1052715_S forward	5'-GGCTACTGTTCTCTTCCAGA -3'	TIB Molbiol, Berlin
rs1052715_A reverse	5'-CATTTTACAACGCAGGTACA -3'	TIB Molbiol, Berlin

Abb.3.2.2: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer; F, A = forward Primer, R, S = backward Primer

3.2.2 Hybridisierungssonden

Zur Identifizierung der DMBT1 SNPs, wurden Hybridisierungssonden eingesetzt, die von der Firma *TIB-Molbiol* synthetisiert wurden.

DMBT1	Primersequenz	Referenz
rs2981745 wt Anc-rs2981745	5'-CAGCAGCAGAAATATACCACCC-FL-3'	TIB Molbiol, Berlin
	5'-640- AGAGGACACACCTCCTTTTAGCTAGGTACCp -3'	TIB Molbiol, Berlin

rs2981778 C	5'-GGATCTTAAGTATCCCTGTTCTTCC-FL- 3'	TIB Molbiol, Berlin
Anc rs2981778	5'-640- TGTTCTCTCTTTGCCCTCTTCTCATTCT P-3'	TIB Molbiol, Berlin

rs11523871 mut	5'-CTTCTGCTACAGTTGTATCCAAGG-FL-3'	TIB Molbiol, Berlin
Anc rs11523871	5'- 640-CACCTCCGAGGGAATCAGTGAAG p-3'	TIB Molbiol, Berlin

rs3013236 mut	5'- 640-GGGTCAACTCCGAGGGAA p-3'	TIB Molbiol, Berlin
Anc rs3013236	5'- AGACGTTACCTTCTGCTACAGTTGACTCC- FL-3'	TIB Molbiol, Berlin

Anc rs2981804	5'-AGGGCAAGGGCAAGGATGC-FL-3'	TIB Molbiol, Berlin
rs2981804 C	5'-640-GTCCTAGCAATTTGGCTACGTTA p -3'	TIB Molbiol, Berlin

rs2277244- 585 A	5'-CAGCGTCTTCACTATAGCCAC-FL-3'	TIB Molbiol, Berlin
Anc585- rs2277244	5'-LC640-GTTGTGGGAGAGCCAGCCA PH-3'	TIB Molbiol, Berlin

rs1052715 mut	5'-ATGCGAAGAGACGGCGAG-FL-3'	TIB Molbiol, Berlin
Anc rs1052715	5'-640- AGTAGGGGTCCGTAGGTGTCATCCCTCA p- 3'	TIB Molbiol, Berlin

Abb.3.2.3: Sequenzen der verwendeten Hybridisierungssonden

3.2.3 Gelelektrophorese

Materialien	Referenz
LE-Agarose	Biozym, Wien, Österreich
TBE-Puffer	Apotheke Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Auftragspuffer	Apotheke Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München
Basenleiter 100bp	Lonza

3.3 Materialien für die Genotypisierung

3.3.1 PCR-Material, PCR-Kits und Sequenzierungs-Kits

Materialien	Referenz
<u>QIAGEN, HotStarTaq® DNA Polymerase 1000 units</u>	Qiagen, Hilden
Coral Load PCR Buffer, 10x, containing 15 mM MgCl ₂	Qiagen, Hilden
HotStarTaq® Plus, DNA Polymerase, 5 units/μl	Qiagen, Hilden
Q-Solution, 5x	Qiagen, Hilden
MgCl ₂ 25mM	Qiagen, Hilden
SIGMA, Deoxynucleotide Mix, 10mM	SIGMA, Steinheim
QIAGEN, QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen, Hilden
Buffer PBI, Binding buffer	Qiagen, Hilden
Buffer PE, Wash buffer (55ml Buffer + 220 ml Ethanol)	Qiagen, Hilden
Buffer EB, Elution buffer	Qiagen, Hilden
QIAquick® Spin Columns	Qiagen, Hilden
Polymerase Mix, Light Cycler®480 Genotyping Master 5x conc.	Roche, Mannheim
HAE III, Restriktionsenzym	BioLabs, England

3.4 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Referenz
LightCycler® 480 Multiwell Plate 384	Roche, Mannheim
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche, Mannheim
Versiegelungsfolie Microseal B	Biozym, Wien, Österreich
Light Cycler®480 Sealing Foil	Roche, Mannheim
Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
Pipettenspitzen (12,5µl)	Matrix, Thermo Scientific, New Hampshire, USA
Reaktionsgefäße 1,6ml, 2,0ml	Biozym, Oldendorf
Wasser für Injektionszwecke 50ml (steril)	Delta Select, Pfullingen
LightCycler® 480, H ₂ O, PCR grade	Roche, Mannheim
Handschuhe Vinyl 2000	Meditrade, Kiefersfelden
Handschuhe Nitril	Semperit, Wien, Österreich

3.5 Geräte

Geräte	Referenz
Light Cycler®480 Instrument 384	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 Block Kit 384	Roche, Mannheim
Pipettierroboter Freedom EVO	Tecan, Männedorf, Schweiz

ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop, Wilmington, USA
Allegra™25R Centrifuge	Beckman Coulter,
Microfuge®18 Centrifuge	Beckman Coulter,
Schüttler Vortex	Thermo Electron Corporation
Sterilbank LaminAir	Holten, Allerød, Dänemark
Pipetten (2,5, 10, 20, 100,200, 1000µl)	Eppendorf
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000µl)	Biohit
8-fach Pipette (12,5 µl)	Matrix,Thermo Scientific, New Hampshire, USA
PCR-Gerät	MJ Rsearch
Gelelektrophoresekammer Sub Cell GT	Biorad, München
Elektrophoresegerät Power Pac	Biorad, München
Feinwage	ADAM ATP-3100L
Variomag Elektronikrührer	Monotherm, Neolab, Heidelberg
Videodokumentationssystem Infinity 3000	Vilber Lourmat
Eismaschine	Thermo Electron Corporation
Abzugskammer	Waldner
Mikrowelle, sharp platinum collection	Sharp
Brutschrank 37°C, Hybaid Shake`n`Stack	Thermo Electron Corporation

3.6 Software

Software	Referenz
Nano Drop	Nano Drop, Wilmington, USA
Light Cycler® 480	Roche, Mannheim
Light Cycler® 480 1,5 version Genotyping Software	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 Quantification Software	Roche, Mannheim
Light Cycler®480 LIMS/Bar-Code Module	Roche, Mannheim
Freedom EVOware	Tecan, Männedorf, Schweiz
PCR-Programm Dyad und Tetrad	Peltier Thermal Cyclers 2003
Microsoft Excel	
Microsoft Word	

4 Methoden

4.1 Allgemeine Vorgehensweise

Die hierfür zu Verfügung stehende genomische DNA diente als Ausgangsmaterial zur Genotypisierung der Polymorphismen. Zunächst wurde für die jeweiligen SNPs das richtige Primerpaar ermittelt. Anschließend wurde mit Hilfe einer sogenannten konventionellen als auch mittels quantitativer (Real time) Polymerasekettenreaktion (siehe 4.2.1 und 4.2.2) die eigentliche Genotypisierung durchgeführt. Als Bestätigung der dadurch erhaltenen Ergebnisse wurde zudem ein externes Labor beauftragt, die vorher hergestellten und gereinigten PCR-Produkte zu sequenzieren (siehe 4.2.6).

4.2 Molekular- und zellbiologische Vorgehensweise

4.2.1 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur *in vitro*-Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten. Diese erstmals von Kary Mullis 1984 (Mullis et al., 1986) veröffentlichte Methode ist heute eine der am meisten benutzten Standardmethoden der Molekularbiologie. Durch die hohe Sensitivität dieser Methode reichen wenige Kopien der Zielsequenz als Vorlage aus. Zudem ermöglicht ihre hohe Spezifität eine selektive Amplifizierung einer einzelnen Sequenz unter Millionen verschiedener Sequenzen. Im Wesentlichen besteht der Reaktionsansatz aus doppelsträngiger DNA, zwei Arten spezifischer Oligonukleotide (Primer) von ca. 15-25 Basen Länge, die jeweils einem Abschnitt am 3'-Ende der Zielsequenz des entsprechenden DNA-Einzelstranges komplementär sind, und der hitzebeständigen *Taq* DNA-Polymerase. Das Reaktionsmuster der PCR besteht aus sich zyklisch wiederholenden Schritten:

Zuerst werden die DNA-Doppelstränge durch Hitzeeinwirkung denaturiert. (Abb. 4.2.1a):

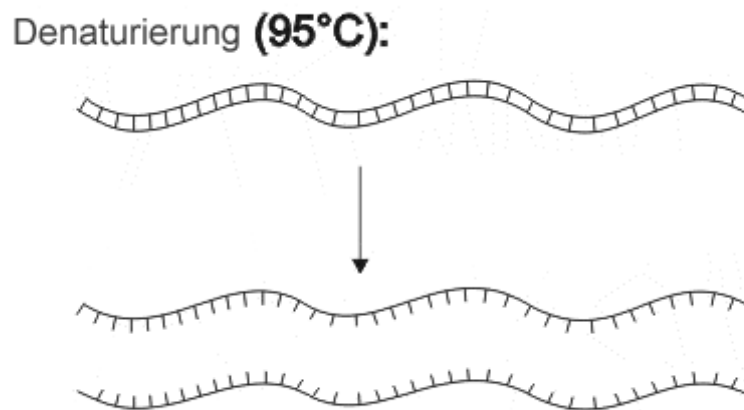


Abb.4.2.1a: Schematische Darstellung der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA in Einzelstränge, durch Temperaturerhöhung auf ca. 95°C.
(Quelle:<http://www.biokurs.de/skripten/bilder/pcr5.gif>)

Hierbei werden aus der bestehenden doppelsträngigen DNA durch Temperaturerhöhung auf ca. 95°C Einzelstränge „denaturiert“. Daraufhin hybridisieren bei niedrigerer Temperatur – der sog. *annealing*-Temperatur (54-63°C) die beiden ausgewählten Oligonukleotide jeweils am 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs (Abb. 4.2.1b):

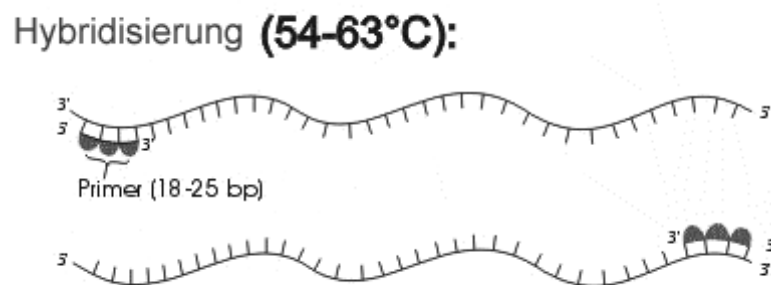


Abb.4.2.1b: Schematische Darstellung der Hybridisierung der beiden ausgewählten Oligonukleotide jeweils am 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs, bei einer Temperatur von 54-63°C.
(Quelle:<http://www.biokurs.de/skripten/bilder/pcr5.gif>)

In diesem Reaktionsschritt dienen die Primer als Ansatzpunkt zur Synthese des jeweils komplementären DNA-Abschnitts der DNA-Einzelstränge. Somit entstehen „neue“ DNA-Doppelstränge. Hierzu ist eine erneute Temperaturerhöhung auf 72-74°C notwendig (Abb. 4.2.1c).

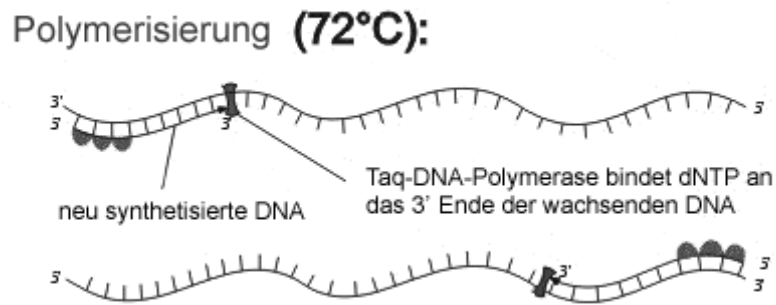


Abb.4.2.1c: Schematische Darstellung der Polymerisierung. Hierzu ist eine erneute die Temperaturerhöhung auf 72°C notwendig, damit „neue“ DNA-Doppelstränge entstehen. Die Primer dienen hierbei als Ansatzpunkt zur Synthese des jeweils komplementären DNA-Abschnitts der DNA-Einzelstränge.
(Quelle:<http://www.biokurs.de/skripten/bilder/pcr5.gif>)

Wiederholt man diese Zyklen aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation mindestens zwanzig Mal, kommt es zur exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz. Der letzte Schritt ist die Endextension bei 72 °C, bei der alle noch nicht komplett amplifizierten PCR-Produkte vervollständigt werden sollen.

Die Nukleinsäure-Amplifikationen wurden in einem Thermocycler der Firma *MJ Research* durchgeführt. Zur Darstellung der entstandenen PCR-Produkte wurden weitere Bearbeitungsschritte notwendig, wie z.B. elektrophoretische Auftrennung (siehe 4.2.5), Anfärben mit Ethidiumbromid (siehe 4.2.5), und Visualisierung unter UV-Licht (siehe 4.2.4).

In der nachfolgenden Tabelle 4.2.1d ist die Zusammensetzung der in dieser Studie angewandten Pipettieransätze und nachfolgend der Programmablauf des Thermocyclers dargestellt (Zusammensetzung im sterilen Reaktionsgefäß für ein Endvolumen von 100 µl):

Substanzen	Volumen	Konzentration
DNA	5,0 µl	
PCR-Reaktionspuffer	10,0 µl	10x konz.
dNTP	2,0 µl	0.25mM
5´-Primer 5,0 nmol (forward)	2,5µl	0.25mM
3´-Primer 5,0 nmol (reverse)	2,5µl	0.25mM
Taq-DNA Polymerase	0,5µl	
Mg ²⁺	nach Mg ²⁺ Verdünnungsreihe für jedes Primerpaar ermittelt	
Destilliertes H ₂ O (steril)	77,5µl - xµlMg ²⁺	

Tabelle 4.2.1d: Zusammensetzung der Pipettieransätze

Zusammenfassung des oben beschriebenen Programmablaufs:

1. Schritt 95°C 5 min Initiale Denaturierung
2. Schritt 95°C 30 s Denaturierung
3. Schritt 65°C 30 s Annealing
4. Schritt 72°C 30 s Elongation 25-40Zyklen
5. Schritt 72°C 5 min Auffüllen der Doppelstränge
6. Schritt 8°C bis zur Entnahme aus dem Thermocycler

Für die jeweiligen Oligonukleotidprimer wurden die PCR-Bedingungen bezüglich der Annealingtemperatur und der Zugabe von Detergenzien, wie MgCl₂, optimiert.

Darstellung der SNP-spezifischen PCR-Protokolle mit entsprechender Annealingtemperatur:

Die Konzentrationen und Mengen der PCR-Reaktionspuffer, des dNTP-Mix, der Taq-Polymerase und der DNA variieren nicht.

Polymorphismus	Substanzen (Konzentration in mM, H ₂ O in µl)	Annealingtemperatur (°C)
rs2981745	- Mg ²⁺ : 12 - H ₂ O: 65,5	60
rs3013236	- Mg ²⁺ : 4 - H ₂ O: 73,5	65
rs1052715	- Mg ²⁺ : 4 - H ₂ O: 73,5	65
rs2981778	- Mg ²⁺ : 6 - H ₂ O: 71,5	60
rs11523871	- Mg ²⁺ : 0 - H ₂ O: 77,5	65
rs2981804	- Mg ²⁺ : 0 - H ₂ O: 77,5	60
rs2277244	- Mg ²⁺ : 0 - H ₂ O: 77,5 - Q-Lösung: 20	60

Tabelle 4.2.1e: Es werden für die jeweiligen SNPs die spezifische Magnesiumkonzentrationen, die daraus resultierende Menge an destilliertem Wasser und die entsprechende Annealingtemperatur angegeben. Für SNP rs2277244 wurde zusätzlich eine stabilisierende Q-Lösung verwendet.

4.2.2 Das LightCycler®480 System

In dieser Arbeit kam das LightCycler 480 Instrument (Roche; Mannheim) mit den dazugehörigen Reagenzien-Sets zum Einsatz. Dadurch konnten die sieben SNPs im DMBT1 Gen mit den Studienpopulationen in einem Arbeitsschritt genotypisiert und gleichzeitig eine hochauflösende Schmelzkurvenanalyse durchzuführen werden. Das plattenbasierte LightCycler 480 System arbeitet mit 96- und 384-well Platten. Durch diese Methode war eine direkte Quantifizierung des PCR-Produktes ohne anschließende DNA-Gelelektrophorese möglich. Dadurch konnte eine Kontamination mit PCR Produkten nahezu ausgeschlossen werden.

4.2.3 Genotypisierung mit dem LightCycler®480

In eine LightCycler® Multiwell Platte können 384 verschiedene DNAs mit dem zuvor hergestellten Mischungsansatz aus Primerpaar, Sonden, Genotyping Master und sterilem Wasser pipettiert werden. Dieser Vorgang wird durch den Pipettierroboter Freedom EVOware (Tecan, Männedorf; Schweiz) innerhalb von 20 Minuten durchgeführt. Der Roboter füllt zunächst systematisch die 384 Loch- Platten mit jeweils 4,5 µl Mix und pipettiert anschließend in entsprechender Reihenfolge 0,5 µl der jeweiligen DNA hinzu. In der Negativ-Kontrolle (NC) fehlt DNA-Eluat.

	Std. 2, 1 000	Std. 3, 2 000	NC	Std. 1, 1.0E2	Std. 2, 1.0E3	Std. 4, 1.0E4	Std. 5, 1.0E5	Std. 6, 1.0E6					Std. 2, 1 000	Std. 3, 2 000											Std. 2, 1 000	Std. 3, 2 000
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
A	2	3	NC	1	2	4	5	6				2	3										2	3		
B			NC	1	2	4	5	6																		
C	2	3	NC	1	2	4	5	6				2	3										2	3		
D																										
E	2	3										2	3										2	3		
F																										
G	2	3										2	3										2	3		
H																										
I	2	3										2	3										2	3		
J																										
K	2	3										2	3										2	3		
L																										
M	2	3										2	3										2	3		
N																										
O	2	3										2	3										2	3		
P																										

Abb. 4.2.3a: Darstellung eines typischen Pipettierungsschemas des Light Cycler 480 mit einer 384er Lochplatte für Durchgang A.

NC= Negativ Kontrolle , **1, 2, 3, 4, 5, 6**,=Standards

(Quelle: Roche Mannheim; aus dem Skript LC 480 Reagenzien: Light Cycler 480 Controll Kit, Version Januar 2006)

Anschließend wird die befüllte 384er Loch-Platte mit einer speziellen Folie verschlossen und danach für 2 Minuten bei 1500g zentrifugiert. Daraufhin werden die Proben in den LightCycler 480 eingelegt, wo die PCR stattfindet.

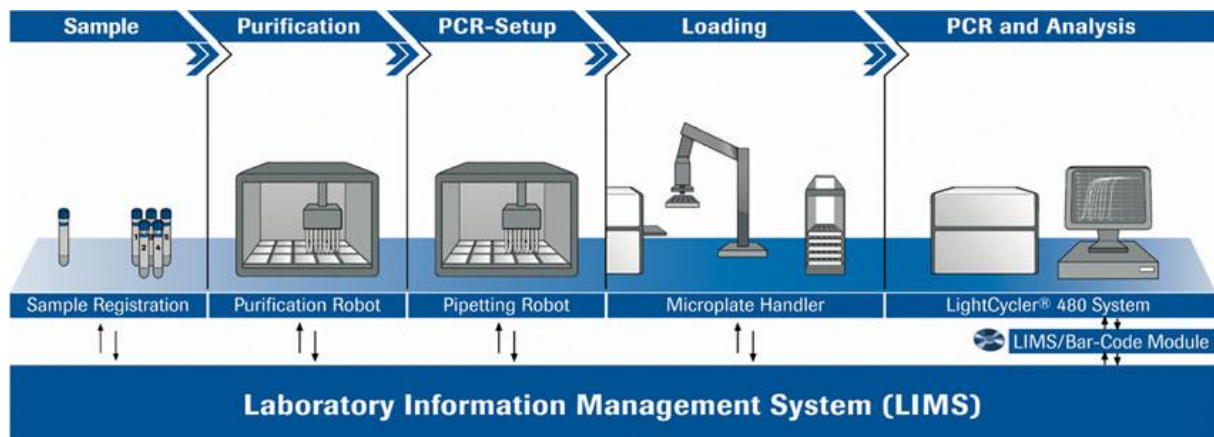


Abb. 4.2.3b: Integration des LightCycler 480 Systems in den Arbeitsvorgang des Pipettierroboters mit automatischem Datenimport, sowie Analyse und Datenexport (Quelle: Roche, Mannheim Skript Martinsried: lightcycler_480_system)

4.2.3.1 Ablauf der Realtime-PCR

In diesem Versuch wird eine Hot-Start Polymerase verwendet. Diese ist chemisch oder mittels eines Antikörpers geblockt, sodass sie erst bei einer Temperatur von $\sim 95^{\circ}\text{C}$ aktiviert wird. Durch diese Eigenschaft wird die Polymerase steuerbar und ein frühzeitiges Anlaufen der PCR bei niedrigeren Temperaturen kann verhindert werden. Zum Aufheben der Blockade findet vor Beginn der PCR eine 10-minütige Denaturierungsphase statt, in der auf 95°C erhitzt wird. Durch die Hitzeentwicklung wird außerdem die DNA denaturiert, sodass sie in Einzelsträngen vorliegt.

Die „Amplifizierungs“-Phase beginnt mit 5 s bei 95°C und wird anschließend auf 62°C herabgekühlt, um diese Temperatur 10 s zu halten. Hier findet die Fluoreszenz-Messung bzw. Detektion statt. Daraufhin folgt ein erneuter Temperaturanstieg auf 72°C , der für 10 s gehalten wird, bevor erneut auf 95°C erhitzt wird. Dann beginnt der Zyklus von neuem. Der Zyklus wird im gesamten Lauf insgesamt 45 Mal wiederholt.

Vorgang	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (Sek.)
Denaturierung	1	95	60
Kühlen	1	62 40	10 2
Schmelzen	1	bis 95°C erreicht sind	

Abb.: 4.2.3.1a: Darstellung des verwendeten Programms für die Schmelzkurvenanalyse. Vor Beginn der PCR findet eine 10-minütige Denaturierungsphase statt, in der die Temperatur auf 95 °C erhöht wird, sodass die DNA in Einzelsträngen vorliegt. Für die anschließende Schmelzkurvenanalyse findet ein weiteres Intervall statt, das mit einem Temperaturabfall auf erst 62°C für 10 s beginnt und dann innerhalb von 2 Sekunden auf 40°C abgekühlt wird. Von 40°C wird die Temperatur kontinuierlich auf 95°C erhöht.

Die Schmelzkurvenanalyse (Genotypisierung) findet am Ende des Laufs während des letzten Temperaturanstiegs statt. Der Verlauf der Schmelzkurve nach Ablauf der Echtzeit-PCR ermöglicht neben dem Nachweis von Mutationen auch die Charakterisierung der Allele (Wildtyp/Heterozygotie/Homozygotie). Die erste Sonde hybridisiert an dem Teil der Targetsequenz, der dem Wildtyp und der Mutante gemeinsam ist. Sie besitzt also dieselbe Sequenz (Anchor). Die zweite Sonde (Sensor oder Detektionssonde) deckt die Mutationsstelle ab. Nach dem letzten Zyklus der Echtzeit-PCR und einem kurzen Denaturierungsschritt wird, die Schmelzkurvenanalyse durch langsames Erhöhen der Temperatur unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz durchgeführt. Dabei soll das Abschmelzverhalten der LightCycler-Sonden (HybProbes) vom Amplifikat erfasst werden. Liegt eine Mutation unter den Sonden vor, kommt es zu einem sogenannten „mismatch“. Die Sonden passen also weniger gut als beim Wildtyp und schmelzen so schneller vom PCR-Produkt ab. Der *FRET* zwischen beiden Sonden wird unterbrochen und das Fluoreszenzsignal wird abgeschwächt. Die Detektionssonden auf den Wildtyp-Amplifikaten lösen sich aufgrund ihrer höheren Bindungsenergie etwas später. Dadurch nimmt das Fluoreszenzsignal erst bei etwas höherer

Temperatur ab. Bei einer heterozygoten Verbindung findet dieser Prozess nacheinander statt.

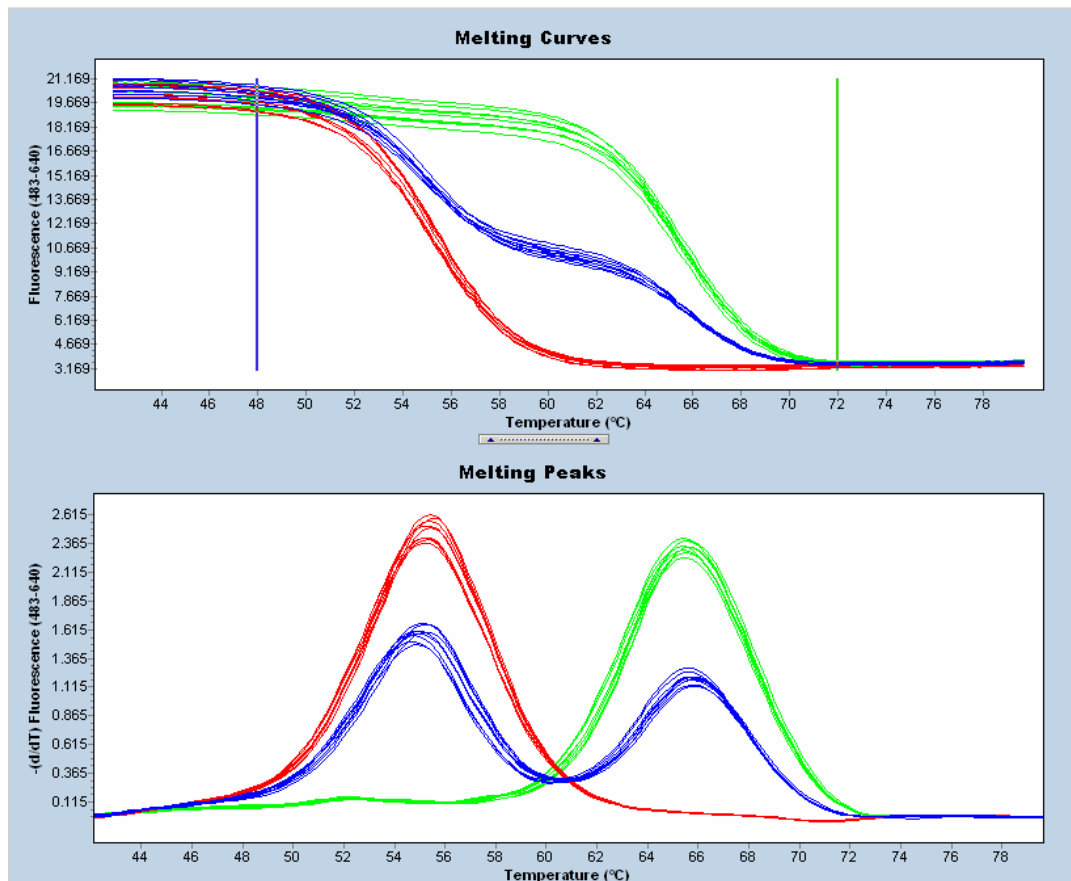


Abb. 4.2.3.1b: Beispiel für eine Darstellung der Allel-spezifischen Quantifizierung durch die Light Cycler® 480 Genotyping Software. Die x-Achse gibt die Temperatur in °C wieder. Die y-Achse gibt die Fluoreszenzintensität ($-dF/dT$) in %/°C wieder. (grün=homozygoter Genotyp-Wildtyp, rot=homozygoter Genotyp-Mutant, blau=heterozygoter Genotyp) Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. (Quelle: Roche, Mannheim Skript Martinsried_2006_Genotypisierung)

Der benötigte Mix für die Realtime-PCR in dieser Studie hatte ein Endvolumen von 5µl. Dieses setzte sich wie folgt zusammen:

- 2,5 pmol von jedem Primer,
- 0,75 pmol von jeder FRET-Sonde (TIB MOLBIOL, Berlin),
- LightCycler480® Genotyping- Master (Roche Diagnostics),
- 25 ng genomische DNA
- und destilliertes Wasser

Die Konzentrationen der Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer mussten zum Teil reduziert werden. Für die SNPs rs2981778 und rs2981804 wurde die Konzentration des Vorwärtsprimers zweifach reduziert. Für den SNP rs1052715 wurde die Konzentration des Rückwärtsprimers ebenso zweifach reduziert. Daraus ergab sich ein Volumen von 1,25 µl. Die Konzentration der Rückwärtsprimer für rs2981745, rs3012230 und rs11523871 wurde auf das Fünffache reduziert, wodurch sich ein Endvolumen von 0,5 µl ergab. Um diesen entstandenen Volumenmangel auszugleichen, wurde die entsprechende Menge an destilliertem Wasser hinzugegeben. Wie oben beschrieben wurde mit 384-well Platten gearbeitet, so dass 384 DNA-Proben gleichzeitig ausgetestet werden konnten. Der dafür benötigte Mix von insgesamt 1080 µl wurde im entsprechenden Verhältnis aus den Primern Sonden, Genotyping Master und destilliertem Wasser hergestellt.

4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentrationen von chromosomaler DNA erfolgte mittels UV-Absorption in wässriger Lösung. Mit Hilfe des Spektrophotometers Nanodrop ND-1000 wurden jeweils 2 µl des unverdünnten Analyten vermessen. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und ihre Reinheit abgeschätzt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei einem Quotienten E_{260} / E_{280} von 1,8 - 2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70-95 %.

$C = OD_{260} \times f / (\epsilon \times d)$	
C	= Konzentration (ng/µl)
OD_{260}	= Absorption bei 260 nm
f	= Verdünnungsfaktor
d	= Schichtdicke (cm)
ϵ	= Extinktionskoeffizient

$OD_{260 \text{ nm}} = 1,0$ doppelsträngiger DNA entsprechen etwa	50 µg DNA / mL
$OD_{260 \text{ nm}} = 1,0$ einzelsträngiger DNA entsprechen etwa	33 µg DNA / mL
$OD_{260 \text{ nm}} = 1,0$ RNA entsprechen etwa	40µg RNA / mL

4.2.5 Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten

Die Agarosegelelektrophorese diente einerseits zur Detektion der PCR-Produkte der konventionellen PCR und zum anderen wurde sie in der Etablierungsphase der real-time PCR zur zusätzlichen Qualitätskontrolle der Amplikons eingesetzt. Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Doppelstrang-DNA-Fragmenten mittels Einwirkung eines elektrischen Feldes. Dabei laufen kürzere DNA-Stränge schneller als die längeren durch die Gelmatrix auf die Anode zu.

Es wurden für die Herstellung des Elektrophoresegels mit einem Endvolumen von 250ml folgende Substanzen in einem Messzylinder vermischt:

6,25g LE Agarose (Biozym, Wien, Österreich)

25ml TBE-Puffer (Apotheke Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Univ. München)

225ml H₂O (entsalzt)

Nach dem Aufkochen der Substanzen in der Mikrowelle (Sharp) bei 900 Watt innerhalb von 400sec wurden 4µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) in das noch kochende Gel zugegeben. Anschließend wurde das heiße Gel unverzüglich in den Gelträger gegossen, in den bereits vor dem Gießen vier Gelkämme mit jeweils 20 Zähnen eingesetzt wurden. Nach dem Erstarren wurden die Kämme entfernt und der Gelträger in die mit Laufpuffer (1 × TBE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid) gefüllte Gelkammer (Biorad, München) gestellt.

Für die Herstellung des benötigten Laufpuffers mit einem Endvolumen von 2 Litern wurden folgende Substanzen gemischt:

200ml TBE-Puffer (Apotheke Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Univ. München)

1800ml H₂O (entsalzt)

30µl Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)

In dieser Studie wurden 5 µl der DNA-Proben mit jeweils 3 µl eines 10-fach konzentrierten Gel-Ladungspuffers in die Taschen des Agarosegels pipettiert und innerhalb von 90 Minuten bei konstanter Spannung von 120 V in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Als Referenz wurde in eine am Rand

gelegene Spur (erstes Loch) 8µl eines 100bp Basenleiters (mit Fragmenten bekannter Größe) mit auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde auch eine Negativkontrolle mit in die Geltaschen eingebracht (letztes Loch). Die im Gel aufgetrennten PCR-Amplifikate wurden schließlich unter einem UV-Dokumentationssystem (UV-Transilluminator) sichtbar gemacht, digital fotografiert und bei Bedarf ausgedruckt.

4.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um nicht inkorporierte Primer, Nukleotide sowie Taq-Polymerase aus dem PCR-Ansatz wieder zu entfernen und die Probe gegebenenfalls aufzukonzentrieren, wurde der QIAquick PCR-Purification Kit nach Angaben des Herstellers Qiagen verwendet.

Die daraus gewonnenen PCR-Produkte wurden durch das Sequenzierunternehmen (Sequiserve, Vaterstetten) sequenziert.

4.3 Statistische Analysen

In der vorliegenden direkten Assoziationsstudie wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis und genetischen Polymorphismen im humanen *DMBT1*-Gen untersucht. Dafür wurde eine Patientengruppe mit einer geeigneten Kontrollgruppe verglichen und die Signifikanz der ermittelten Assoziationsstärke berechnet. Zum Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen der Untersuchungsgruppe und der Kontrollgruppe kam der Fisher's Exact Test zum Einsatz. Mit Hilfe des Pearson-Chi-Quadrat-Tests wurde die Genotypenverteilung zwischen Patientengruppe und Kontrollgruppe ausgewertet. Die Verteilung der Genotypfrequenzen in beiden Testgruppen, wurde mit den bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes erwarteten Frequenzen verglichen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanz) wurde für alle Tests auf $p < 0,05$ festgelegt.

Die Odds-Ratio wurde jeweils für das seltenere Allel bei jedem SNP mit 95%-igem Konfidenzintervall berechnet. Die statistischen Daten wurden mit dem Programm SPSS 13.0 ermittelt. (SPSS Inc., Chicago, USA) und <http://www.hutchon.net/ConfindOR.htm>. Die P-Werte wurden zum einen mit dem Programm PLINK v 1.07 und zum anderen mit Hilfe von <http://www.graphpad.com/quickcalcs/idx.cfm> berechnet. Die Haplotypfrequenzen und die Stärke des Kopplungsungleichgewichts wurden nach den Formel von Arnold und Albert (Arnold 1976) bzw. Baur und Danilovs (Baur 1980) berechnet. Für die Berechnung der Haplotypfrequenzen wurden die zuvor berechneten Allelfrequenzen verwendet. Die Haplotypberechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms PLINK v 1.07 durchgeführt (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). Das Kopplungsungleichgewicht wurde mit dem Programm SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/en/SNPStats_web) berechnet.

4.3.1 Berechnung des Kopplungsungleichgewichts

Die sieben ausgewählten Polymorphismen im *DMBT1*-Gen wurden bezüglich ihres Kopplungsungleichgewichts untersucht. Ein Kopplungsungleichgewicht oder „*linkage disequilibrium*“ besteht, wenn zwei Allele an zwei benachbarten Genorten häufiger gemeinsam vererbt werden, als man es durch Zufall in einer Population erwarten würde (Murken, 2006). Um Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen SNPs ziehen zu können, muss das „*linkage disequilibrium*“ messbar gemacht werden. Dafür können unterschiedliche statistische Maße verwendet werden. Bei dem LD-Koeffizient ist D von der Allel-Frequenz in der Population abhängig.

Sein maximaler Wert ist durch $D_{max} = \min(p_1q_2, p_2q_1)$ gegeben, der minimale Wert über $D_{min} = \max(-p_1q_1, -p_2q_2)$ (Lewontin, 1964).

Lewontins theoretisches Maximum D' ergibt sich dann aus $D' = D/D_{max}$ oder $D' = D/D_{min}$. Außerdem kann das Quadrat des Korrelationskoeffizienten herangezogen werden, das von Devlin und Risch definiert wurde (Devlin and Risch, 1995):

$$r^2 = D^2 / (p_A p_a p_B p_b)$$

D' und der Kopplungsungleichgewichtskoeffizient r^2 befinden zwischen 0 und 1 und sind damit leicht interpretierbar. Liegt der Koeffizient näher an 1, umso höher ist das „*linkage disequilibrium*“. Wird der Koeffizient 0, besteht keinerlei Zusammenhang zwischen zwei Loci (Lewontin, 1964, Lewontin, 1988). Lewontins Disequilibriumskoeffizient D' kann an Hand folgender Tabelle erklärt werden:

		SNP 1		Gesamt
		Allel B1	Allel B2	
SNP 2	Allel B	P_{11}	P_{12}	P_1
	Allel b	P_{21}	P_{22}	p_2
	Gesamt	q_1	q_2	1

Tabelle 4.3.1: Beispiel zur Berechnung von „*linkage disequilibrium*“

4.4 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Der Vergleich der Verteilungen der Genotypfrequenzen in beiden Gruppen (Parodontitisgruppe vs. Kontrollgruppe) mit den erwarteten Verteilungen bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes lässt folgende durchwegs nicht-signifikante Unterschiede erkennen. Die Kontrollgruppe entspricht somit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Mit folgenden Formeln konnten die erwarteten Genotypfrequenzen aus den beobachteten Frequenzen errechnet werden (Murken, 2006):

p^2 für AA

pq und qp für Aa und

q^2 für aa

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

4.5 Bonferroni-Korrektur

Je mehr Hypothesen man auf einem Datensatz testet, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit, dass eine davon (fehlerhaft) als zutreffend angenommen wird. Man bezeichnet das auch als α -Fehler-Inflation, womit die globale Erhöhung der Alpha-Fehler-Wahrscheinlichkeit durch multiples Testen in derselben Stichprobe bezeichnet wird. Soll diese α -Fehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen neutralisiert werden, kann das mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur (nach Carlo Emilio Bonferroni) erzielt werden. Die Bonferroni-Korrektur wird durch Teilung des α -Niveaus durch die Zahl (n) der durchgeführten Tests vorgenommen (Victor, 2010). Dabei wird das globale α -Niveau zu gleichen Teilen auf die Einzeltests verteilt. Die Kumulierung des α -Fehlers der einzelnen Tests kann nun nicht mehr das Gesamtsignifikanzniveau übersteigen und wird mit folgender Formel berechnet (Bland and Altman, 1995).

$$\alpha_{\text{adjustiert}} = 0,05/n$$

5 Ergebnisse

5.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Im Rahmen der vorliegenden direkten genetischen Assoziationsstudie wurde untersucht, ob bestimmte Allele bei Personen mit chronischer Parodontitis (CP) häufiger oder seltener auftreten, als bei parodontal gesunden Kontrollindividuen. Im Kandidatengen *DMBT1*, wurden sieben Einzelnukleotidpolymorphismen typisiert. Es existieren für jeden Polymorphismus jeweils zwei Allele und somit drei verschiedene Genotypen. Mit Hilfe der Real-Time PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse, konnte jedes der 388 untersuchten Individuen einem der drei möglichen Genotypen zugeordnet werden. Außerdem wurden die Genotypenhäufigkeit und deren Verteilung sowie die Verteilung der Allele beschrieben und zwischen Patienten- und Kontrollgruppe verglichen. Die signifikanten Assoziationen (p-Werte) der SNPs im *DMBT1*-Gen bezogen auf das Krankheitsbild der chronischen Parodontitis, wurden berechnet und tabellarisch dargestellt.

Es werden in diesem Kapitel auch die Ergebnisse der deskriptiven Datenanalyse bezüglich der Altersstruktur, der Verteilung der Geschlechter, sowie der Raucher und Nichtraucher tabellarisch dargestellt.

Um die Validität der eigenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden zusätzlich die Allel- und Genotypfrequenzen innerhalb der Kontrollgruppe mit den Daten anderer Normalpopulationen verglichen. Es wurden Berechnungen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes für alle 7 Polymorphismen vorgenommen. Die beobachteten Allel- und Genotypfrequenzen homozygoter und heterozygoter Individuen stimmten mit den erwarteten Frequenzen überein. Folglich befinden sich die zwei Gruppen der Studienpopulation im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, was systematische Fehler bei der Zusammenstellung der Studienpopulation sowie bei der Typisierung nicht annehmen lässt.

5.2 Demographische Daten der Studienpopulation

Die Untersuchungsgruppe dieser Studie umfasste insgesamt 388 Patienten, die an chronischer Parodontitis erkrankt waren. Der Altersdurchschnitt betrug $52,3 \pm 14,5$ Jahre (Standardabweichung), wobei das Minimum bei 18 Jahren und das Maximum bei 84 Jahren lag.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Verteilungen (Tabelle 5.2): Die gesamte Studiengruppe setzte sich aus 204 (52,6%) Frauen und 184 (47,4%) Männern zusammen. Davon waren 116 (29,9%) Raucher und 252 (64,9%) Nichtraucher.

Die verwendete Kontrollgruppe wurde aus einer Population mit insgesamt 762 parodontal gesunden Personen zusammengestellt. Davon waren 513 (67,3%) männlich und 249 (32,7%) weiblich. Der Altersmittelwert der 788 Kontrollpersonen lag bei 47,1 mit einer Standardabweichung von $\pm 9,8$ Jahren. Dabei ergab sich eine Altersspanne von 35 bis 68 Jahren. In der Kontrollgruppe befanden sich 666 (87,4%) Nichtraucher und 95 (12,5%) Raucher.

	Parodontitisfälle (chron. Parodontitis)	Kontrollpersonen
Anzahl	388	762
Frauen	204 (52,6%)	249 (32,7%)
Männer	184 (47,4%)	513 (67,3%)
Raucher	116 (29,9%)	95 (12,5%)
Nichtraucher	252 (64,9%)	666 (87,4%)
Keine Angaben zum Rauchverhalten	20 (5,2%)	1 (0,1%)
Altersmittel* (Jahre)	52,4 ($\pm 14,5$)	47,1 ($\pm 9,8$)
Altersspanne (Jahre)	18-84	35-68

Tabelle 5.2: Charakteristika der Studienteilnehmer in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe (*mit Standardabweichung).

5.3 Polymorphismen im DMBT1-Gen

5.3.1 Polymorphismus rs2981745 (SNP – 93)

SNP rs2981745	Genotyp/ Allel	Chronische Parodontitis n=388			Kontrollgruppe n=762
		Anzahl/ Frequenz(%)	p-Wert	OR [95%CI]	Anzahl/ Frequenz (%)
	CC	182 (46,9)	0,851	1,024 [0,80-1,31]	353 (46,3)
	CT	162 (41,8)	0,8995	0,980 [0,75-1,23]	322 (42,3)
	TT	44 (11,3)	1,000	0,992 [0,68-1,46]	87 (11,4)
	C	526 (67,8)	0,888	1,015 [0,84-1,22]	1028 (67,5)
	T	250 (32,2)	0,888	0,985 [0,82-1,19]	496 (32,5)

Tabelle 5.3.1 Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP rs2981745 im DMBT1-Gen bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Test bzw. Fisher's-Exact-Test. Tabellarisch dargestellt sind zusätzlich die p-Werte und die odds ratio (OR)+ 95% Konfidenzintervall (CI).

Bei der statistischen Auswertung der Allel- beziehungsweise Genotypverteilung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Parodontitispatienten mit gesunden Kontrollindividuen.

Die Genotyp- und Allelverteilung war in beiden Gruppen sehr ähnlich. Am seltensten vertreten war sowohl in der Gruppe der Patienten mit chronischer Parodontitis als auch in der Kontrollgruppe der homozygote Genotyp TT (CP11, 3% vs. K 11,4%). Die Genotypen CC und CT kamen in beiden Gruppen ähnlich häufig vor (CC 46,9% vs. 46,3% und CT 41,8% vs. 42,3%). In beiden Gruppen war T das mutierte Allel (MAF=32,2% vs. 32,5%; $p=0,888$, OR 0,985 [0,82-1,19])

5.3.2 Polymorphismus rs2981778

SNP rs2981778	Genotyp/ Allel	Chronische Parodontitis n=388			Kontrollgruppe n=762
		Anzahl/ Frequenz(%)	p-Wert	OR [95%CI]	Anzahl/ Frequenz (%)
	GG	181 (46,6)	0,7548	0,96 [0,75-1,23]	348 (45,6)
	GA	163 (42,0)	0,7529	1,04 [1,81-1,34]	328 (43,0)
	AA	44 (11,3)	1,000	0,99 [0,68-1,46]	86 (11,2)
	G	525 (67,6)	0,8508	0,98 [0,81-1,18]	1024 (67,1)
	A	251 (32,3)	1,0213	1,00 [0,85-1,23]	500 (32,8)

Tabelle 5.3.2 Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP rs2981745 im DMBT1-Gen bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Test bzw. Fisher's-Exact-Test. Tabellarisch dargestellt sind zusätzlich die p-Werte und die Odds Ratio (OR)+ 95% Konfidenzintervall (CI).

Die Genotypverteilung der Mutation rs2981778 war für beide untersuchten Gruppen annähernd gleich. Mit 46,6% in der CP Gruppe und 45,6% in der Kontrollgruppe, war der homozygote Genotyp GG nur wenig häufiger vertreten als der heterozygote Genotyp GA (42,0% vs. 43,0%). Das Allel A war in beiden Gruppen mit 32,3% vs. 32,8% das seltene Allel (p=1,0213, OR 1,00 [0,85-1,23]). Dieser SNP zeigte keine Assoziation mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis.

5.3.3 Polymorphismus rs11523871 (p.Pro42Thr)

SNP rs11523871	Genotyp/ Allel	Chronische Parodontitis n=388			Kontrollgruppe n=762
		Anzahl/ Frequenz(%)	p-Wert	OR [95%CI]	Anzahl/ Frequenz (%)
	AA	67 (17,3)	0,0001	0,244 [0,18-0,33]	351 (46,1)
	AC	161 (41,5)	0,752	0,95 [0,74-1,22]	325 (42,7)
	CC	160 (41,2)	0,0001	5,516 [4,08-7,46]	86 (11,3)
	A	295 (38,0)	0,0001	0,297 [0,25-0,36]	1027 (67,3)
	C	481 (61,9)	0,0001	3,37 [2,81-4,03]	497 (32,6)

Tabelle 5.3.3 Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP rs11523871 im DMBT1-Gen bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Test bzw. Fisher's-Exact-Test. Tabellarisch dargestellt sind zusätzlich die p-Werte und die odds ratio (OR)+ 95% Konfidenzintervall (CI). Signifikante p- und OR-Werte sind fett markiert

Der homozygote Genotyp AA der Kontrollgruppe zeigte sich statistisch signifikant häufiger als in der Patientengruppe (46,1% vs. 17,3%, $p=0,0001$). Am seltensten war in der Kontrollgruppe der homozygote Genotyp CC mit 11,3% vertreten. Dieser kam in der Patientenkohorte statistisch signifikant häufiger vor (41,2% vs. 11,3% $p=0,0001$, OR 5,516 [4,08-7,46]).

Das C Allel, war sowohl in der Parodontitisgruppe als auch in der Kontrollgruppe das seltenere Allel. Dieses Allel kam jedoch in der Patientengruppe signifikant häufiger vor, als im Kontrollkollektiv (61,9% vs. 32,6%, $p=0,0001$, OR 2,81[2,81-4,03]).

Der SNP rs11523871 war somit signifikant mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis assoziiert. Die höhere Frequenz des mutierten Allels in der Patientengruppe lässt auf einen erhöhenden Effekt bezüglich des Erkrankungsrisikos für das C-Allel schließen.

5.3.4 Polymorphismus rs3013236 (p.Leu54Ser)

SNP rs3013236	Genotyp/ Allel	Chronische Parodontitis n=388			Kontrollgruppe n=762
		Anzahl/ Frequenz(%)	p-Wert	OR [95%CI]	Anzahl/ Frequenz (%)
	TT	181 (46,6)	1,00	1,0025 [0,78-1,28]	355 (46,6)
	TC	163 (42,0)	1,000	0,0005 [0,80-1,24]	320 (42,0)
	CC	44 (11,3)	1,00	0,992 [0,68-1,46]	87 (11,4)
	T	525 (67,6)	1,00	1,003 [0,83-1,21]	1030 (67,5)
	C	251 (32,3)	1,00	0,997 [0,83-1,20]	494 (32,4)

Tabelle 5.3.4 Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP rs3013236 im DMBT1-Gen bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Test bzw. Fisher's-Exact-Test. Tabellarisch dargestellt sind zusätzlich die p-Werte und die Odds Ratio (OR)+ 95% Konfidenzintervall (CI).

In der statistischen Auswertung für rs3013236 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Genotypverteilung oder den Allelfrequenzen. Die Genotyp- und Allelverteilung war in beiden Gruppen annähernd gleich. Am häufigsten in beiden Gruppen vertreten waren sowohl der homozygote Genotyp TT (CP 46, 6% vs. K 46, 6%), als auch das Allel T (67,6% und 67,5%).

5.3.5 Polymorphismus rs2981804

SNP rs2981804	Genotyp/ Allel	Chronische Parodontitis n=388			Kontrollgruppe n=762
		Anzahl/ Frequenz(%)	p-Wert	OR [95%CI]	Anzahl/ Frequenz (%)
	GG	92 (23,7)	0,018	0,71 [0,54-0,94]	232 (30,4)
	GA	192 (49,4)	0,261	1,15 [0,90-1,47]	350 (45,9)
	AA	104 (26,8)	0,248	1,18 [0,89-1,57]	180 (23,6)
	G	376 (48,4)	0,0273	0,82 [0,69-0,97]	814 (53,4)
	A	400 (51,5)	0,0273	1,22 [1,03-1,45]	710 (46,5)

Tabelle 5.3.5 Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP rs2981804 im DMBT1-Gen bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Test bzw. Fisher's-Exact-Test. Tabellarisch dargestellt sind zusätzlich die p-Werte und die Odds Ratio (OR)+ 95% Konfidenzintervall (CI). Signifikante p- und OR-Werte sind fett markiert.

Der homozygote Genotyp GG der Kontrollgruppe war in der Patientengruppe statistisch signifikant häufiger (K 30,4% vs. CP 23,7%, $p=0,018$) anzutreffen. Am häufigsten vertreten war in beiden Gruppen der heterozygote Genotyp GA (CP 49,4%, K 45,9%).

Das seltenere A-Allel kam in der Patientengruppe signifikant häufiger vor, als in der Kontrollgruppe (CP 51,5% vs. K 46,5%, $p=0,0273$, OR 1,22[1,03-1,45]). Das Allel G hingegen kam in der Kontrollgruppe signifikant häufiger vor als in der Untersuchungsgruppe (CP 48,4% vs. K 53,4%, $p=0,0273$, OR 0,82[0,69-0,97]). Dem G-Allel könnte somit ein protektiver Effekt für die Träger zukommen.

5.3.6 Polymorphismus rs2277244 (p.His585Tyr)

SNP rs2277244	Genotyp/ Allel	Chronische Parodontitis n=388			Kontrollgruppe n=762
		Anzahl/ Frequenz(%)	p-Wert	OR [95%CI]	Anzahl/ Frequenz (%)
	CC	365 (94,0)	1,00	0,996 [0,59-1,67]	717 (94,0)
	CT	22 (5,6)	1,00	0,96 [0,57-1,61]	45 (5,8)
	TT	1 (0,25)	0,337	-	0 (0)
	C	754 (97,2)	0,893	0,95 [0,56-1,60]	1483 (97,1)
	T	22 (2,8)	1,00	0,96 [0,57-1,61]	45 (2,9)

Tabelle 5.3.6 Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP rs2277244 im DMBT1-Gen bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Test bzw. Fisher's-Exact-Test. Tabellarisch dargestellt sind zusätzlich die p-Werte und die Odds Ratio (OR)+ 95% Konfidenzintervall (CI).

Die Allel- und Genotypfrequenz war in beiden Studiengruppen unterschiedlich. Am häufigsten war in beiden Gruppen der homozygote Genotyp CC (CP 94,0% und K 94,0%) vertreten. Entsprechend zeigte sich auch in der Allelverteilung, die höchste Frequenz für das C-Allel (CP 97,2% und K 97,1%). Es konnte lediglich in der Patientengruppe Individuen mit dem TT Genotyp gefunden werden. Der heterozygote Genotyp CT fiel in beiden Gruppen durch eine sehr niedrige Frequenz auf (CP 5,6% und K 5,8%). Die Allelfrequenz des seltenen T Allels in der Parodontitisgruppe mit 2,8% zeigte gegenüber der Kontrollgruppe mit 2,9% keinen signifikanten Unterschied ($p=1,00$, OR 0,96 [0,57-1,61]).

5.3.7 Polymorphismus rs1052715 (p.Pro1707Pro) (SNP2348)

SNP rs1052715	Genotyp/ Allel	Chronische Parodontitis n=388			Kontrollgruppe n=762
		Anzahl/ Frequenz(%)	p-Wert	OR [95%CI]	Anzahl/ Frequenz (%)
	AA	132 (34,0)	0,844	0,973 [0,75-1,26]	264 (34,6)
	AG	182 (46,9)	1,00	1,008 [0,79-1,29]	356 (46,7)
	GG	74 (19,0)	0,873	1,029 [0,75-1,41]	142 (18,6)
	A	446 (57,4)	0,823	0,979 [0,82-1,17]	884 (58,0)
	G	330 (42,5)	0,823	1,022 [0,86-1,22]	640 (41,9)

Tabelle 5.3.7 Allel- und Genotypfrequenzen für den SNP rs1052715 im DMBT1-Gen bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des χ^2 -Test bzw. Fisher's-Exact-Test. Tabellarisch dargestellt sind zusätzlich die p-Werte und die Odds Ratio (OR)+ 95% Konfidenzintervall (CI).

Es fand sich keine signifikante Assoziation der Parodontitis mit dem Polymorphismus rs1052715. Der heterozygote Genotyp AG war in der Patientengruppe am häufigsten vertreten (46,9%), während im Kontrollkollektiv der homozygote Genotyp AA die höchste Frequenz aufwies (34,6%). Die Frequenz des mutierten G- Allels zeigte keinen signifikanten Unterschied (42,5% vs. 41,9%, $p=0,823$, OR 1,022 [0,86-1,22]) zwischen den beiden Studiengruppen.

5.4 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele in der Gesamtpopulation

Es konnten starke Ähnlichkeiten zwischen den SNPs rs 2981745, rs2981778 und rs3013236 bezüglich der Genotypverteilung (Tabelle 5.4) und der Häufigkeit der Allele (Tabelle 5.5.1) festgestellt werden.

Auffallend waren die signifikanten Assoziationen der SNPs rs1152387 ($p < 0,001$) und rs2981804 ($p < 0,001$) im *DMBT1*-Gen im Vergleich mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis und der Kontrollpopulation.

SNP	Genotyp	Parodontitis	N	Kontrollen	N	p-Wert
rs2981745	TT	44 (11,3%)	388	87 (11,4%)	762	0,982
	TC	162 (41,8%)		322 (42,3%)		
	CC	182 (46,9%)		353 (46,3%)		
rs 2981778	AA	44 (11,3%)	388	86 (11,2%)	762	0,942
	AG	163 (42,0%)		328 (43,0%)		
	GG	181 (46,6%)		348 (45,7%)		
rs11523871	CC	160 (41,2%)	388	86 (11,3%)	762	<0,001
	CA	161 (41,5%)		325 (42,7%)		
	AA	67 (17,4%)		351 (46,1%)		
rs3013236	CC	44 (11,3%)	388	87 (11,4%)	762	1,00
	CT	163 (42,0%)		320 (42,0%)		
	TT	181 (46,6%)		355 (46,6%)		
rs2981804	AA	104 (26,8%)	388	180 (23,6%)	762	<0,001
	AG	192 (49,5%)		350 (45,9%)		
	GG	92 (23,7%)		232 (30,4%)		

rs2277244	TT	1 (0,26%)	388	0 (0%)	762	0,370
	TC	22 (5,7%)		45 (5,90%)		
	CC	365 (94,1%)		717 (94,1%)		
rs1052715	GG	74 (19,1%)	388	142 (18,6%)	762	0,972
	GA	182 (46,9%)		356 (46,7%)		
	AA	132 (34,0%)		264 (34,6%)		

Tabelle 5.4 Genotypverteilungen beider Testgruppen mit p-Wert (2x3 FelderChi-Quadrat-Test)

5.5 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele in Bezug zum Rauchverhalten

Hier wurde nach möglichen signifikanten Assoziationen zwischen den getesteten SNPs und nach Stratifikationen der Studienpopulation hinsichtlich des Rauchverhaltens im Vergleich zu der Kontrollgruppe gesucht (Tabelle 5.5.1).

5.5.1 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Raucher

Es wurden in der Untergruppe der Raucher (Tabelle 5.5.1) signifikante Unterschiede für die Polymorphismen rs1152387 und rs2277244 festgestellt ($p = <0,001$). Für den SNP rs1152387 waren dabei in der Patientengruppe 62,5% homozygote CC-Träger, während in der Kontrollgruppe nur 11,6% diese Kombination hervorbrachten. Die heterozygote Mutation CA für diesen SNP betrug in der Parodontitisgruppe 31,3% und in der Kontrollpopulation 43,2%.

SNP	Genotyp	Parodontitis	N (MAF)	Kontrollen	N	p-Wert
rs2981745	TT	1 (6,26%)	16 (0,219)	12 (12,6%)	95 (0,332)	0,462
	TC	5 (31,3%)		39 (41,1%)		
	CC	10 (62,5%)		44 (46,3%)		
rs 2981778	AA	2 (12,5%)	16 (0,313)	12 (12,6%)	95 (0,337)	0,934
	AG	6 (37,5%)		40 (42,1%)		
	GG	8 (50,0%)		43 (45,3%)		
rs11523871	CC	10 (62,5%)	16 (0,219)	11 (11,6%)	95 (0,332)	<0,001
	CA	5 (31,3%)		41 (43,2%)		
	AA	1 (6,25%)		43 (45,3%)		
rs3013236	CC	1 (6,25%)	16 (0,219)	12 (12,6%)	95 (0,337)	0,422
	CT	5 (31,3%)		40 (42,1%)		
	TT	10 (62,5%)		43 (45,3%)		
rs2981804	AA	5 (31,3%)	16 (0,469)	20 (21,1%)	95 (0,432)	0,600
	AG	7 (43,8%)		42 (44,2%)		
	GG	4 (25,0%)		33 (34,7%)		
rs2277244	TT	0 (0%)	16 (0,031)	0 (0%)	95 (0,016)	<0,001
	TC	1 (6,25%)		3 (3,2%)		
	CC	15 (93,8%)		92 (96,8%)		
rs1052715	GG	0 (0%)	16 (0,219)	17 (18,1%)	94 (0,399)	0,137
	GA	7 (43,8%)		41 (43,6%)		
	AA	9 (56,3%)		36 (38,3%)		

Tabelle 5.5.1: Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Raucher mit der englischen Abkürzung MAF (*minor allele frequency*) wird die Häufigkeit des selteneren Allels bezeichnet. Je häufiger ein Allel vorkommt (höhere MAF), desto größer ist sein potentiell krankheitsfördernder Effekt.

5.5.2 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Nichtraucher

In der Nichtrauchergruppe zeigte sich bei der Genotypenverteilung des Polymorphismus rs1152387 eine signifikante Assoziation (Tabelle 5.5.2). In der Parodontitisgruppe konnte, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine überzufällige Häufung von Trägern des Wildtyps AA festgestellt werden (CP: 20,8% vs. K: 11,2%), während die Anteile der heterozygoten (CA) und homozygoten (CC) Mutation geringer als in der Kontrollgruppe waren.

SNP	Genotyp	Parodontitis	N (MAF)	Kontrollen	N (MAF)	p-Wert
rs2981745	TT	29 (11,8%)	246 (0,321)	76 (11,4%)	666 (0,326)	0,900
	TC	100 (40,7%)		282 (42,3%)		
	CC	117 (47,6%)		308 (46,2%)		
rs 2981778	AA	27 (11,0%)	245 (0,331)	74 (11,1%)	667 (0,326)	0,959
	AG	108 (44,1%)		287 (43,0%)		
	GG	110 (44,9%)		306 (45,9%)		
rs11523871	CC	94 (38,4%)	245 (0,412)	309 (46,3%)	667 (0,325)	<0,001
	CA	100 (40,8%)		283 (42,4%)		
	AA	51 (20,8%)		75 (11,2%)		
rs3013236	CC	26 (10,6%)	246 (0,311)	76 (11,4%)	667 (0,323)	0,890
	CT	101 (41,1%)		279 (41,8%)		
	TT	119 (48,4%)		312 (46,8%)		
rs2981804	AA	61 (24,9%)	245 (0,502)	161 (24,4%)	660 (0,472)	0,238
	AG	124 (50,6%)		301 (45,6%)		
	GG	60 (24,5%)		198 (30,0%)		
rs2277244	TT	1 (0,41%)	245 (0,093)	0 (0%)	665 (0,032)	0,241
	TC	17 (6,9%)		42 (6,3%)		
	CC	227 (92,7%)		623 (93,7%)		
rs1052715	GG	44 (17,9%)	246 (0,425)	125 (18,7%)	670 (0,422)	0,844
	GA	121 (49,2%)		315 (47,0%)		
	AA	81 (32,9%)		230 (34,3%)		

Tabelle 5.5.2 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Nichtraucher

5.6 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele in Bezug zum Geschlecht

5.6.1 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Frauen

In der Gruppe der weiblichen Probanden zeigte sich bei der Verteilung der Genotypen für die beiden Polymorphismen rs1152387 und rs2277244 SNP ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) (Tabelle 5.6.1). Dabei waren bei dem Polymorphismus rs1152387 in der Patientengruppe 16,2% homozygote AA-Träger, während in der Kontrollgruppe 46,4% diesen Genotyp zeigten. In der Parodontitisgruppe konnte, verglichen mit der Kontrollgruppe, eine Häufung von homozygoten Trägern des mutierten C-Allels festgestellt werden (CP: 37,9% vs. K: 8,5%). Die Anteile der heterozygoten Mutation hingegen fiel ähnlich aus (CP: 46,0% vs. K: 45,2%).

SNP	Genotyp	Parodontitis	N (MAF)	Kontrollen	N (MAF)	p-Wert
rs2981745	TT	22 (11,1%)	198 (0,333)	21 (8,5%)	248 (0,306)	0,614
	TC	88 (44,4%)		110 (44,4%)		
	CC	88 (44,4%)		117 (47,2%)		
rs 2981778	AA	25 (12,7%)	197 (0,332)	20 (8,1%)	248 (0,306)	0,253
	AG	81 (41,1%)		112 (45,2%)		
	GG	91 (46,2%)		116 (46,8%)		
rs11523871	CC	75 (37,9%)	198 (0,391)	21 (8,5%)	248 (0,310)	<0,001
	CA	91 (46,0%)		112 (45,2%)		
	AA	32 (16,2%)		115 (46,4%)		
rs3013236	CC	25 (12,6%)	198 (0,356)	21 (8,5%)	248 (0,306)	0,256
	CT	91 (46,0%)		110 (44,4%)		
	TT	82 (41,4%)		117 (47,2%)		

rs2981804	AA	51 (26,0%)	196 (0,497)	58 (23,7%)	245 (0,514)	0,850
	AG	95 (48,5%)		122 (49,8%)		
	GG	50 (25,5%)		65 (26,5%)		
rs2277244	TT	0 (0%)	195 (0,028)	0 (0%)	302 (0,028)	<0,001
	TC	11 (5,6%)		9 (3,0%)		
	CC	184 (94,4%)		293 (97,0%)		
rs1052715	GG	36 (18,2%)	198 (0,422)	48 (19,4%)	258 (0,433)	0,939
	GA	95 (48,0%)		119 (48,0%)		
	AA	67 (33,8%)		81 (32,7%)		

Tabelle 5.6.1 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Frauen

5.6.2 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Männer

Bei den männlichen Probanden konnten signifikante Assoziationen festgestellt werden (Tabelle 5.6.2).

Eine grenzwertig statistische Signifikanz ($p = 0,04$) zeigte sich für den Polymorphismus rs2981804. In der Kontrollgruppe konnte, verglichen mit der Parodontitisgruppe, eine Häufung von GG-Allelträgern festgestellt werden (CP: 23,5% vs. K: 33,5%).

Weitere signifikante Unterschiede wurden für die Polymorphismen rs1152387 und rs1052715 festgestellt ($p = <0,001$). Für den SNP rs1152387 lag eine Häufung der CC-Träger (CP: 44,8% vs. K: 12,7%) vor, während die homozygote AA-Mutation in der Parodontitisgruppe mit 18,8% deutlich seltener vorkam als in der Kontrollgruppe (45,8%). Für den Polymorphismus rs1052715 konnte in der Patientengruppe verglichen mit der Kontrollgruppe, eine Häufung von Trägern der homozygoten Mutation AA (CP: 34,3 % vs. K: 24,9 %) und heterozygoten Mutation GA (CP: 48,1: % vs. K: 42,2%) festgestellt werden. Die Anteile der Homozygoten des Wildtyps GG waren hingegen in der Parodontitisgruppe vermindert (CP: 17,7% vs. K: 33,0%).

SNP	Geno- typ	Parodontitis	N (MAF)	Kontrollen	N (MAF)	p-Wert
rs2981745	TT	21 (11,6%)	181 (0,307)	67 (13,1%)	512 (0,337)	0,564
	TC	69 (38,1%)		211 (41,2%)		
	CC	91 (50,3%)		234 (45,7%)		
rs 2981778	AA	19 (10,6%)	179 (0,318)	66 (12,9%)	512 (0,339)	0,719
	AG	76 (42,5%)		215 (42,0%)		
	GG	84 (46,9%)		231 (45,1%)		
rs11523871	CC	81 (44,8%)	181 (0,370)	65 (12,7%)	511 (0,335)	<0,001
	CA	66 (36,5%)		212 (41,5%)		
	AA	34 (18,8%)		234 (45,8%)		
rs3013236	CC	19 (10,5%)	181 (0,287)	66 (12,9%)	511 (0,334)	(%) 0,272
	CT	66 (36,5%)		209 (40,9%)		
	TT	96 (53,0%)		236 (46,2%)		
rs2981804	AA	50 (27,9%)	179 (0,478)	117 (23,1%)	507 (0,448)	0,04
	AG	87 (48,6%)		220 (43,4%)		
	GG	42 (23,5%)		170 (33,5%)		
rs2277244	TT	1 (0,05%)	181 (0,033)	0 (0%)	510 (0,035)	0,192
	TC	10 (5,5%)		36 (7,1%)		
	CC	170 (93,9%)		474 (92,9%)		
rs1052715	GG	32 (17,7%)	181 (0,417)	183 (33,0%)	555 (0,412)	<0,001
	GA	87 (48,1%)		234 (42,2%)		
	AA	62 (34,3%)		138 (24,9%)		

Tabelle 5.6.2 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele der Männer

5.6.3 Kopplungsungleichgewicht

Für die SNP-Paare rs2981745 und rs2277244, rs2981778 und rs2277244 sowie rs3013236 und rs2277244 ergab sich $D'=1$, was eine vollständige Kopplung bedeutet. Für die Haplotypanalyse rs1052715 und rs2981778 ($p=0,03$), sowie rs1052715 und rs2981804 ($p=0,01$) konnte eine Assoziation mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis gefunden werden.

DMBT1 SNPs	rs 2981745	rs 2981778	rs 11523871	rs 3013236	rs 2981804	rs 2277244	rs 1052715
Chronische Parodontitis							
rs2981745	*	0.86/ 0.86	0.74/ 0.60	0.959/ 0.957	0.50/ -0.34	1.00/ -0.12	0.02/ -0.01
rs2981778	*	*	0.78/0.64	0.87/ 0.87	0.71/ -0.48	1.00/ -0.12	0.08/ -0.05
rs11523871	*	*	*	0.74/ 0.60	0.10/ 0.09	0.07/ -0.01	0.01/ 0.01
rs3013236	*	*	*	*	0.50/ -0.33	1.00/ -0.12	0.06/ -0.03
rs2981804	*	*	*	*	*	0.44/ -0.07	0.06/ -0.05
rs2277244	*	*	*	*	*	*	0.65/ 0.13
rs1052715	*	*	*	*	*	*	*

p-Werte	rs 2981745	rs 2981778	rs 11523871	rs 3013236	rs 2981804	rs 2277244	rs 1052715
rs2981745	*	0	0	0	0	0	0.56
rs2981778	*	*	0	0	0	0	0.03
rs11523871	*	*	*	0	0	0.60	0.56
rs3013236	*	*	*	*	0	0	0.10
rs2981804	*	*	*	*	*	3e-04	0.01
rs2277244	*	*	*	*	*	*	0
rs1052715	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 5.6.3: Kopplungsungleichgewichtsanalysen für die *DMBT1*-SNPs bei Patienten mit chron. Parodontitis und p-Werte. Die Werte werden als D'/r^2 angegeben: je näher D' und r^2 gegen 1 gehen, umso stärker ist das Kopplungsungleichgewicht.

5.7 Haplotypenfrequenzen im *DMBT1*-Gen

Gemeinsam vererbte Allele von eng gekoppelten Genorten eines Chromosoms bilden einen Haplotyp. Über das komplette Genom verteilt bilden sich somit sogenannte Haplotypblöcke. Das sind Bereiche, die in der Regel ohne *crossing-over*-Trennung weitervererbt werden. Zwischen diesen Sequenzen entstehen mehr oder weniger stark ausgeprägte Kopplungsungleichgewichte (Knippers, 2006).

Es ergaben sich im Vergleich der Allel- und Genotypfrequenzen der Polymorphismen zwischen den Parodontitispatienten und der Kontrollgruppe mehrere signifikante Assoziationen. Außerdem wurden die Haplotypfrequenzen der sieben SNPs im *DMBT1*-Gen zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppen verglichen, um mögliche Assoziationen zu erkennen.

5.7.1 Haplotypenfrequenzen im *DMBT1*-Gen bei chronischer Parodontitis

Die Haplotypfrequenzen der Kontroll- und Parodontitisgruppe sind in Tabelle 5.7.1 dargestellt.

Die Frequenzen der sechs verschiedenen Haplotypen zwischen den beiden Gruppen zeigten signifikante Unterschiede. Die signifikanten p-Werte liegen zwischen $1,97 \times 10^{-40}$ und $1,41 \times 10^{-180}$.

Die stärkste Assoziation wurde für den Haplotyp bestehend aus den SNPs rs11523871-rs3013236 mit einem p-Wert von $1,41 \times 10^{-180}$ gefunden. Darunter ist die Allelkombination CT am signifikantsten assoziiert mit einer Haplotypfrequenz von 41,3% in der Parodontitisgruppe gegenüber 1,4% in der Kontrollgruppe und einem p-Wert von $7,007 \times 10^{-141}$. Die schwächste Assoziation zeigte sich im Haplotyp T-A für rs3013236-rs2981804 mit einer Frequenz von 43,4% in der Parodontitisgruppe gegenüber 38,9% in der Kontrollgruppe und einem p-Wert von 0,03693. Die Allelkombinationen CA und CG in diesem Haplotyp (rs3013236-rs2981804) sind nicht signifikant assoziiert. Für die Haplotypen bestehend aus den SNPs rs2981804-rs2277244 und rs2277244-rs1052715 wurden keine signifikanten Assoziationen beobachtet.

Haplotypen	Parodontitis			Kontroll- gruppe
	HF	P-Wert	OR [95 % CI]	HF
rs2981745-rs2981778		1,97x10⁻⁴⁰		
TA	0,25	0,0004	0.71	0.32
CA	0,07	1,03x10⁻²⁰	10.9	<0.01
TG	0,07	4,29x10⁻²²	16.1	0.0032
CG	0,60	0,0017	0.75	0.66
rs2981778-rs11523871		3,54x10⁻¹⁷¹		
AC	0,22	6,595x10⁻⁶	0.61	0.31
GC	0,39	2,92x10⁻¹³⁸	188	<0.01
AA	0,10	2,36x10⁻²⁴	9.45	0.01
GA	0,28	2,22x10⁻⁶⁵	0.20	0.66
rs11523871-rs3013236		1,41x10⁻¹⁸⁰		
CC	0,20	6,65x10⁻⁸	0.54	0.31
AC	0,11	5,87x10⁻²⁹	9.49	0.01
CT	0,41	7,01x10⁻¹⁴¹	20.1	0.01
AT	0,26	5,72x10⁻⁷¹	0.18	0.65

Tabelle 5.7.1 Haplotypanalyse (2-punkt Haplotypen) für die *DMBT1*-Polymorphismen bei chronischer Parodontitis: Haplotyp-Frequenz-Vergleich mit der Kontrollgruppe. (HF): Haplotypfrequenz, P-Werte, (OR): Odds ratios mit einem 95% Konfidenzintervall (CI). Signifikante P-Werte sind fett markiert.

Fortsetzung der Tabelle 5.7.1:

rs3013236-rs2981804		0,1009		
CA	0,07	0,779	0.95	0.07
TA	0,43	0,037	1.20	0.38
CG	0,24	0,937	1.01	0.24
TG	0,24	0,027	0.83	0.28
rs2981804-rs2277244		0,1721		
GT	0,02	0,923	0.964	0.02
AC	0,50	0,062	1.17	0.46
GC	0,47	0,066	0.85	0.51
rs2277244-rs1052715		0,9788		
TG	0,02	0,892	1.04	0.02
CG	0,39	0,863	0.98	0.39
CA	0,58	0,897	1.01	0.57

Tabelle 5.7.1 Haplotypanalyse (2-punkt Haplotypen) für die *DMBT1*-Polymorphismen bei chronischer Parodontitis: Haplotyp-Frequenz-Vergleich mit der Kontrollgruppe. (HF): Haplotypfrequenz, P-Werte, (OR): Odds ratios mit einem 95% Konfidenzintervall (CI). Signifikante P-Werte sind fett markiert.

5.8 Ergebniszusammenfassung nach angewandter Bonferroni-Korrektur

Für die hier vorliegende Studie ergibt sich bei den sieben untersuchten Polymorphismen ein adjustiertes α von 0,007 für jeden Einzeltest, wenn das Signifikanzniveau insgesamt bei 0,05 liegen soll. Jeder Test, der einen p-Wert kleiner als 0,007 hat, gilt dann als statistisch signifikant. Korrelationen mit einem Wahrscheinlichkeitswert größer als 0,007 gelten als nicht-signifikant.

Die genetische Analyse lieferte nach angewandter Bonferroni-Korrektur zusammenfassend folgende Ergebnisse:

- Bei dem SNP rs11523871 der insgesamt sieben untersuchten Mutationen (rs2981745; rs2981778; rs11523871; rs30132336; rs2981804; rs2981804, rs22772244 und rs1052715) konnte eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis nachgewiesen werden. Der adjustierte p-Wert für den SNP rs11523871 lag bei $<0,0001$.
- Drei der sechs berechneten Haplotypen wiesen signifikante Ergebnisse auf.
- Die stärkste Assoziation zeigte sich für den Haplotyp bestehend aus den SNPs rs11523871-rs3013236 mit einem p-Wert von $7,01 \times 10^{-141}$.
- Es zeigten sich in der Parodontitisgruppe nach Stratifikationen hinsichtlich Nikotinabusus und Geschlecht signifikante Assoziationen mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis:
 - Der *DMBT1*-Polymorphismus rs11523871 zeigte sich in der Parodontitisgruppe für die Risikostratifizierung „Rauchen“ mit einem deutlich höheren Anteil an CC-Allelträgern (CP:62,5% vs. K:11,6%). Die Träger von heterozygoten als auch der von AA- Allelen wiesen einen geringeren Prozentsatz gegenüber der Kontrollgruppe auf (CA= CP:31,3% vs. K:43,2%; AA=6,25% vs. 45,3%). Bei dem SNP rs2277244 kam im Patientenkollektiv der heterozygote Genotyp häufiger vor (TC= CP:6,25 vs. K:3,16%) und die CC-Mutation seltener (CC= CP:93,8 vs. K:96,8%). Die P-Werte lagen jeweils unter 0,001.

- Bei den Nichtrauchern ergaben sich ebenso wie bei den Rauchern für den Polymorphismus rs11523871 ein signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Die Träger des heterozygoten Genotyps waren auch in dieser Untergruppe in der Patientenkohorte häufiger aufzufinden als bei den Kontrollen (CA=CP:48,8% vs. K:42,4%).
- Auch die Genotypverteilung und Häufigkeit der Allele im Bezug auf das weibliche Geschlecht, brachte zwei signifikante Assoziationen zwischen den SNPs rs11523871, rs2277244 und der chronischen Parodontitis hervor. Das Signifikanzniveau lag für diese beiden Polymorphismen unter 0,001. In beiden Mutationen waren die heterozygoten Allele in der Patientengruppe anteilmäßig häufiger vertreten als in der Kontrollpopulation.
- Bei den männlichen Probanden zeigten sich zwei starke Assoziationen mit einem p-Wert $<0,001$ für die SNPs rs11523871 und rs1052715.

6 Diskussion

6.1 Studiendesign

Das Interesse an genetischen Untersuchungen nimmt stetig zu, auch wenn zum gegenwärtigen Zeitpunkt deren Aussagekraft noch begrenzt ist (Lewis et al., 2009). Neue Ansätze und moderne Techniken, insbesondere die systematische Suche nach erkrankungsassoziierten Genen mit Hilfe von genomweiten Assoziationsstudien, haben zu einem großen Fortschritt geführt. Diese genetischen Untersuchungsmethoden sind besonders aus klinischer Sicht relevant, wenn sie im Sinne der Patienten genutzt werden können. Zum Beispiel, um eine bessere Vorhersage des Krankheitsverlaufs treffen zu können.

Genetische Assoziationsstudien sind Ansätze zur Suche nach Suszeptibilitätsgenen, die für die Entstehung komplexer Erkrankungen mit polygenem Erbgang verantwortlich sein könnten. Hierbei sollen statistische Zusammenhänge zwischen genetischen Variationen und definierten qualitativen oder quantitativen Merkmalen erforscht werden. Kandidatengenanalysen sind direkte Assoziationsstudien. Dabei wird untersucht, ob bestimmte Genvarianten bei Trägern einer Erkrankung häufiger oder seltener vorkommen als bei den gesunden Kontrollpatienten. Zum Auffinden krankheitsverursachender Gene werden in genetischen Studien Kandidatengene eingesetzt. Diese Marker sind variable Orte im Genom, die unter Umständen selbst nicht kausal sind für eine Erkrankung, sich aber idealerweise in sehr naher physikalischer und genetischer Nachbarschaft zu einer ursächlichen Gen-Mutation befinden. Die wichtigsten Marker für genetische Untersuchungen sind VNTRs (variable number tandem repeat) und Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs). SNPs sind einzelne Positionen von Nukleotiden, an denen mehr als eine mögliche Base vorkommen kann (Knippers, 2006). Sie finden sich in großer Häufigkeit über das gesamte Genom verteilt. Dass die Auftretenswahrscheinlichkeit von SNPs mindestens 1% der jeweiligen Population betragen muss (Knippers, 2006), ist nach der Einführung modernster molekulargenetischer Methoden inzwischen überholt. Die Frequenz der SNPs ist von der genomischen Region und der Population abhängig. Durchschnittlich treten sie alle 100-200 Basenpaare auf.

Da durch sogenannte Hochdurchsatzuntersuchungen der Kosten- und Zeitaufwand geringer geworden sind, ist die Zahl der genetischen Assoziationsstudien in den

letzten Jahren stark angestiegen. Es wurden allein zwischen 2007 und 2009 durch genomweite Assoziationsstudien annähernd 1000 SNPs identifiziert, die mit Erkrankungen assoziiert werden können (Visscher and Montgomery, 2009). Derzeit sind fast 18 Millionen SNPs katalogisiert (dbSNP bei NCBI, Stand Juli 2009). Durch die starke Zunahme an genetischen Assoziationsstudien, die zudem teilweise mit einer hohen Rate an nicht replizierbaren Ergebnissen einhergeht, sind allerdings Zweifel hinsichtlich der Validität von direkten Assoziationsstudien aufgekommen (Weitkunat et al., 2010).

Mehrere wissenschaftliche Arbeitsgruppen legten dar, dass viele der Ergebnisse der Studien nicht genügend aussagekräftig zu sein scheinen. *Ioannidis et al.* betiteln die Erkenntnisse einzelner Assoziationsstudien als „provisorisches Wissen“ und ermahnen, solche Studien außerordentlich vorsichtig zu interpretieren (Ioannidis, 2006). Erstuntersuchungen in Assoziationsstudien zwischen genetischen Varianten und Krankheiten würden oft ihre wahre Resultatgröße überschätzen (Boffetta et al., 2008) und seien nicht oder nur unzureichend reproduzierbar (Thomas and Clayton, 2004).

Besonders die Fallzahl der untersuchten Studienpopulation ist dabei entscheidend. Sie sollte hinreichend groß sein, um mit der gewünschten statistischen Power die zu erwartenden kleinen bis mittleren genetischen Effekte auch unter den Bedingungen einer allelischen Heterogenität und des multiplen Testens nachweisen zu können (Lohmueller et al., 2003). Außerdem sollte eine Stichprobe umso größer sein, je niedriger die Prävalenz und der phänotypische Effekt der gesuchten Genvariante und je höher die Anzahl der geprüften Genorte ist (Folwaczny, 2012a). *Lohmeuller et al.* postulierten, dass Studienergebnisse erst als wahrscheinlich gelten, wenn zwei Studien die Assoziationen mit $p < 0,01$ oder eine einzelne Studie mit $p < 0,001$ nachgewiesen hatten (Lohmueller et al., 2003). Studienpopulationsgrößen wie in der vorliegenden Arbeit von 1150 (388 Patienten/762 Kontrollen) Individuen sind nicht sehr gering, dennoch wäre es aus biomathematischen Überlegungen besser Studienpopulationen mit mehreren tausend phänotypisierten Patienten zu generieren, um präzisere Aussagen treffen zu können. Zurzeit können Studienpopulationen von solchem Umfang nur durch Zusammenschluss mehrerer Forschungsgruppen in wissenschaftlichen Konsortien erreicht werden (Folwaczny,

2012a, Lettre et al., 2011, McGovern et al., 2010). Um die Studieneffektivität weiter zu erhöhen, so *Folwaczny* weiter, kann ein mehrstufiges Studiendesign gewählt werden (Folwaczny, 2012a). Die genomweite Suche wird in der ersten Stufe lediglich an einem geringen Teil der Population vorgenommen. In der zweiten oder dritten Stufe werden in größeren Untergruppen nur solche Genvarianten betrachtet, die in denjenigen Regionen des Genoms liegen, die bereits in der ersten Stufe an der Erkrankungsentstehung beteiligt waren (Lowe et al., 2004).

Pharoah et al. sprechen von falsch positiven Ergebnissen: *"that most initial reports are false positive, and the most common reason for this is simply chance/type I error, exacerbated by publication bias"* (Pharoah et al., 2004). Bei falsch-positiven Ergebnissen beruht die scheinbare Assoziation in Wirklichkeit auf dem Einfluss eines Confounders. Darunter versteht man unterschiedliche, nicht erfasste Störfaktoren die zum einen mit dem untersuchten Polymorphismus und zum anderen mit der Erkrankung und dem Studiendesign assoziiert sind.

In dieser Studie wurden die Confounder mit dem größten Einfluss (Geschlecht, Nikotinabusus) in die Auswertung einbezogen. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass weitere unbekannte Faktoren z.B. genetischer Natur die untersuchte Assoziation systematisch verfälscht haben.

Zu falsch positiven Ergebnissen kann es auch kommen, wenn die Studienpopulation aus verschiedenen genetischen Subpopulationen besteht und deshalb nicht erkannte Stratifikationen in Krankheitsrisiko und Allelfrequenzen auftreten. *Loos et. al* bestätigten diese Aussage und wiesen nach, dass die Prävalenzen von allen Polymorphismen zwischen unterschiedlichen ethnischen Gruppen variieren (Loos et al., 2005). Zudem ist bekannt, dass es Gene gibt, bei denen eine Prädisposition für Krankheiten nachgewiesen wurde, die sich aber nur im Phänotyp von Menschen bestimmter ethnischer Herkunft auswirken. Beispielsweise beeinflussen Varianten des NOD2-Gens die Pathogenese von Morbus Crohn ausschließlich bei Kaukasiern, nicht aber bei Asiaten, obwohl das klinische Erscheinungsbild der Krankheit identisch ist (Croucher et al., 2003). Um solche und andere Störfaktoren so gering wie möglich zu halten, wurde in dieser Arbeit eine sorgfältige Zusammenstellung der Studienpopulation aus rein deutscher genetischer Herkunft erfüllt. Eine Gewährleistung für genetische Homogenität bieten Familien-Fallkontrollstudien.

Hierbei stellen die Verwandten der Patienten die Kontrollindividuen dar. Dieses Studiendesign ist allerdings kosten- und zeitaufwendig (Colhoun et al., 2003), da es schwierig ist mehrere Individuen einer Familie zu testen.

Neben den Problemen der Interpretation von Assoziationsanalysen müssen auch eventuell bestehende Kopplungsungleichgewichte zwischen den untersuchten Polymorphismen beachtet werden (Hinds et al., 2006). Zu einem Kopplungsungleichgewicht kann es kommen, wenn bei den gefundenen genetischen Assoziationen nicht der ursächliche Basenaustausch im eigentlichen pathogenitätsrelevanten Locus entdeckt wurde, sondern stattdessen sogenannte SNPs gefunden wurden, welche dann gekoppelt vererbt werden. Auch die zweifelsfreie und reproduzierbare Typisierung der Allele, der zu untersuchenden Polymorphismen muss gewährleistet sein, um valide Ergebnisse in einer Assoziationsstudie zu erhalten. Hierfür sollten alle Genotypisierungen unter konstanten Bedingungen und standardisierten labortechnischen Parametern durchgeführt werden. Ein weiterer nicht zu unterschätzender Schwachpunkt vieler Studien liegt auch in der Datenpräsentation. Es werden oft nur die p-Werte allein angegeben, obwohl durch die zusätzliche Darstellung von OR mit 95% CI und MAFs, das Problem der Erzeugung von falsch-positiven Ergebnissen vermindert werden kann (Sterne and Davey Smith, 2001).

Essentiell ist auch, dass sich die Genotypverteilung der Kontrollgruppe im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet. Somit können systematische Fehler (zum Beispiel durch Stratifikationen) bei der Populationszusammenstellung ausgeschlossen werden (Colhoun et al., 2003).

6.1.1 Eigenes Studiendesign

Bei der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine direkte Assoziationsstudie zu den genetischen Hintergründen der chronischen Parodontitis (CP). Es wurden sieben Polymorphismen im *DMBT1*-Gen bei 388 Patienten mit CP und 762 Kontrollindividuen mittels real-time PCR und Schmelzkurventechnologie

genotypisiert. Außerdem wurden die Allel- und Genotypfrequenzen der Patientengruppe mit der Kontrollgruppe statistisch verglichen. Zudem wurden die Daten nach Stratifikationen und nach dem Rauchverhalten der Patienten analysiert.

Die Auswahl der untersuchten SNPs basierte auf unterschiedlichen Vorergebnissen. *Renner et al.* fanden für die SNPs rs2981745, rs3013236 und rs1052175 Assoziationen mit *Morbus Chron* und *Colitis ulcerosa*. Die vier weiteren SNPs wurden mittels Daten des internationalen HapMap Projektes ausgesucht. Dadurch wurde die Haplotypblockorganisation des gesamten *DMBT1*-Gens plus flankierende 10kb zur Abdeckung potentieller regulatorischer Sequenzen berücksichtigt.

Die SNPS rs3013236, rs2277244 und rs11523871 sind so genannte „*non-synonymous*“ Mutationen, da es durch die Mutation jeweils zu einem Aminosäureaustausch in einer kodierenden Sequenz kommt (T/C Substitution mit p.Leu54Ser Austausch; C/T Substitution mit p.His585Tyr Austausch und C/A Substitution mit p.Pro42Thr Austausch). Die restlichen SNPs (rs2981745, rs1052715, rs2981778, und rs2981804) sind „*silent*“ Mutations. Diese haben keine Veränderung in der Aminosäuresequenz zur Folge. Die SNPs rs2981778 und rs2981804 (G/A Substitution und G/A Substitution) liegen jeweils in einem Intron. Die SNPs rs2981745 und rs1052715(=p.Pro1707Pro) sind zusätzlich synonyme Mutationen, da diese keine Veränderung der Aminosäuresequenz induzieren. Der SNP rs2981745, liegt in einer UTR5' Region im ersten Exon. UTR 5' ist die untranslatierte Region“ am 5' Ende der DNA. Dieser Randbereich der mRNA, wird nicht translatiert. Er enthält aber verschiedene regulatorische Sequenzen, wie Proteinbindungsstellen, die auch für die Stabilität der mRNA zuständig sind. Der SNP rs1052175 (A/G Substitution mit p.Pro1707Pro) befindet sich im letzten Exon des Gens.

Für die hier beschriebene Kandidatengenanalyse wurden insgesamt 388 Patienten mit chronischer Parodontitis sowie 762 gesunde, nicht verwandte Kontrollindividuen rekrutiert. Die Populationen sind kaukasischer Herkunft und stammen aus dem süddeutschen Raum. Die Diagnose des Krankheitsbildes der chronischen Parodontitis wurde anhand standardisierter klinischer Kriterien gestellt (Kinane et al., 2005). Die demographischen Charakteristika (Alter, Geschlecht und Rauchverhalten) wurden durch die Patientenakten unabhängig vom Genotyp erhoben und statistisch verglichen. Die Kontrollindividuen sind im Durchschnitt 47,0 Jahre alt, während die

Patienten 52,3 Jahre alt waren. Dies entspricht einer Differenz von ca. fünf Jahren und sollte bei dem Vergleich beider Gruppen berücksichtigt werden. Auch das Verhältnis der geschlechtsabhängigen Verteilung der Genotypen innerhalb der beiden Gruppen ist nicht gleich. In der Patientenpopulation herrscht ein ausgewogeneres Verhältnis der beiden Geschlechter, als bei den Kontrollindividuen. Dieser höhere Prozentsatz seitens der männlichen Individuen, muss bei geschlechtsbezogenen Vergleichen beachtet werden.

6.1.2 Validität der Genotypisierungsmethoden

Eine sehr wichtige Voraussetzung für die Durchführung einer Assoziationsstudie ist, neben einem geeigneten Studiendesign, die sichere und zweifelsfreie Identifizierung sämtlicher bereits bekannter Allele des zu untersuchenden Polymorphismus (Colhoun et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Analyse der Polymorphismen die Schmelzkurventechnologie mit Hybridisierungssonden verbunden mit einer PCR Amplifikation eingesetzt. Diese Methode basiert auf einer Bindung der Hybridisierungssonden an die Mutationsstelle und der Übermittlung der Lage des Basenaustausches über die Schmelzpunkte und über die Fluoreszenz (Wittwer et al., 2001). Diese Methode ist sehr zuverlässig, zeit- und kostensparend. Die Spezifität und Validität dieser Genotypisierungsmethode konnte in mehreren unabhängigen Studien nachgewiesen werden (Hampe et al., 2001, Hayden et al., 2008). Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte LightCycler 480 ist ein Real Time-PCR-System, das zum Nachweis von DNA-Variationen (Genotypisierung) im Hochdurchsatz dient. Von dem Programm werden die Kurven abhängig vom Verlauf der Schmelzkurve zu drei Lagern gruppiert: homozygot Wildtyp, homozygot Mutant und heterozygoter Genotyp. Anhand der Temperatur der *melting-peaks* wird bestimmt, um welche Basenpaarkombination und somit um welchen Genotyp es sich handelt (Montgomery et al., 2007). Ein entscheidender Vorteil von Real-Time Detektion ist die direkte Quantifizierung des PCR-Produktes ohne anschließende DNA-Gelelektrophorese. Dadurch kann eine Kontamination mit PCR Produkten

nahezu ausgeschlossen werden (von Ahsen et al., 1999, Reed and Wittwer, 2004). In der vorliegenden Studie wurden FRET-Hybridisierungs sonden verwendet. (siehe Methoden Absatz 4.2.2). Für die Güte des Nachweisverfahrens durch den LightCycler 480 spielen Sensitivität (Empfindlichkeit) und Spezifität (Genauigkeit) der Methode eine wichtige Rolle. Durch die hohe Sensitivität des LightCycler 480 wird sichergestellt, dass alle gesuchten Genotypen vom Test auch tatsächlich richtig erkannt werden. Die analytische Sensitivität ist ein Maß für die kleinste nachweisbare Konzentration der zu untersuchenden Substanz (Hallbach, 2006). Die hohe Spezifität gewährleistet, dass nur die Proben als positiv erkannt werden, die tatsächlich von Erkrankten stammen. Die analytische Spezifität steht für ein Maß, inwieweit ein verwendetes Verfahren nur die zu untersuchenden Substanzen erfasst

Alle anderen Testergebnisse müssen bei hochspezifischen Tests negativ sein (Hampe et al., 2001, Hayden et al., 2008). Um die richtige Zuordnung der Genotypen nochmals zu bestätigen, wurden für jeden SNP alle drei möglichen Genotypen zusätzlich sequenziert.

Zur Analyse wurden Primer verwendet, die bereits in früheren Studien beschrieben wurden und in ihrer spezifischen Wirksamkeit mittels Sequenzierung überprüft wurden und somit anerkannt sind (di Giovine et al., 1992, Bioque et al., 1995, Glas et al., 2004, Folwaczny et al., 2004a).

Die Allel- und Genotypfrequenzen der vorliegenden Arbeit zeigen im Vergleich mit den Daten von Referenzpopulationen (www.ncbi.nlm.nih.gov; www.hapmap.org) sehr ähnliche Verteilungen für west- bis mitteleuropäische Kaukasier (siehe Absatz 6.5). Auch diese Beobachtung bestätigt die Validität der hier durchgeführten Genotypisierung.

6.1.3 Grundlagen der DNA-Quantifizierung durch Real time-PCR

Alle Real time-PCR-Systeme beruhen auf der kontinuierlichen Messung eines Fluoreszenz-Signals, welches proportional zum entstehenden Amplifikat ansteigt. Die Akkumulation entstehender PCR-Produkte bewirkt unter optimalen Bedingungen einen proportionalen Anstieg der gemessenen Intensität (Heid et al., 1996). Die

Fluoreszenz kann entweder durch in DNA interkalierende Farbstoffe (**sequenzunspezifische** Signale) oder durch **sequenzspezifische** Hybridisierungssonden erzeugt werden (Wittwer et al., 2001).

Bei dem Einsatz von DNA-bindenden Farbstoffen, wie z. B. Ethidiumbromid und *SYBR Green* wird eine sequenzunabhängige Detektion der entstandenen PCR-Produkte ermöglicht (Wittwer et al., 1997). Der am häufigsten eingesetzte Cyanin-Farbstoff *SYBR Green I*, zeigt in ungebundenem Zustand keine Fluoreszenz. Erst durch Interkalation in die doppelsträngige (ds) DNA wirkt er stark fluoreszierend (Morrison et al., 1998).

SYBR-Green kann praktisch auf allen Realtime-Plattformen angewendet werden. Ein positiver Aspekt dieser Technik sind die geringen Kosten, sowie die hohe Empfindlichkeit. Von Nachteil ist, dass jedes doppelsträngige PCR-Produkt Signale generiert, was dazu führt, dass auch ein unspezifisches Amplifikat detektiert, wodurch eine ungenauere Analyse entsteht.

Die sequenzspezifische Detektion erfolgt mit Sonden, die innerhalb des Amplifikates binden.

Die in dieser Studie verwendeten *Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer Hybridisierungssonden (FRET)* nehmen eine Sonderstellung ein. Diese mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Oligonukleotide, sogenannte fluorogene Sonden, binden spezifisch an eine durch Primer flankierte DNA-Sequenz und lösen durch unterschiedliche auf Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (*FRET*) basierende Mechanismen eine detektierbare Fluoreszenzemission aus (Cardullo et al., 1988). Bei diesem Prozess wird Energie strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Molekülen mit überlappenden Emissions- und Absorptionsspektren übertragen (Stryer and Haugland, 1967).

Zu den bekanntesten Varianten von Real-time-Detektionssystemen gehören:

- FRET-Hybridisierungssonden (Lay and Wittwer, 1997)
- TaqMan-Sonden
- Molecular Beacon
- Sunrise-Primer
- Scorpion-Primer

Eine weitere häufig eingesetzte Möglichkeit des *FRET* besteht in der Verwendung der *TaqMan-Sonden*. Diese besitzen an ihrem einen Ende ein Fluoreszenzsignal und an dem anderen einen Quencher. Während der Synthese wird die TaqMan-Sonde aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität am 5'-Ende abgebaut. Dadurch entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander, wodurch das Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Diese Messung findet in jedem Zyklus am Ende der Elongation statt (Murken, 2006).

Eine weitere Möglichkeit der Echtzeit-Quantifizierung von PCR-Produkten unter Ausnutzung des *FRET* bietet die Nutzung von *Molecular Beacons* als Sonden. *Molecular Beacons* sind sogenannte Haarnadelsonden. Diese bindet an sequenzspezifische Regionen, die durch eine Schleife (gegenläufige Sequenzwiederholung) repräsentiert werden. Hier sind Reporter- und Quencher-Moleküle an jedem Ende der Sonde angeheftet. Durch Anlagerung der Schleifen-Region an eine komplementäre DNA-Sequenz während eines PCR-Zyklus, wird der enge Kontakt zwischen Quencher und Reporter vergrößert. Eine Reporter-Fluoreszenz kann somit ungehindert erfolgen (Rolle, 2007, Tyagi et al., 1998).

Die *Sunrise-Primer* entsprechen den *Molecular Beacons*. Sie sind selbstkomplementär und entfalten sich durch die Synthese des Gegenstranges. Naturgemäß geben auch sie Fluoreszenzsignale aufgrund von unspezifischen Produkten und Primer-Dimeren ab (www.tib-molbiol.de/de/lightcycler/principle/formats.html).

Scorpion-Primer vereinigen die Eigenschaften von Real-Time-PCR-Sonden und PCR-Primern in einem (Uni-Scorpion) oder zwei Molekülen (Bi-Scorpion). Sie besitzen wie die *Molecular Beacons* eine charakteristische Sekundärstruktur mit einer selbstkomplementären Schacht-Region, deren Enden mit einem Reporter-Fluorophor und einem Quencher modifiziert wurden. Außerdem tragen diese Sonden am 3'-Ende einen PCR-Primer. Während eines PCR-Zyklus kann mit steigender DNA-Konzentration eine Reporter-Fluoreszenz durch Anlagerung der Loop-Region an eine komplementäre DNA-Sequenz und damit vergrößerten Abstand zwischen Quencher und Reporter beobachtet werden (Caplin, 1999, Solinas et al., 2001).

6.2 Hinweise auf eine Rolle von genetischen Faktoren in der Pathogenese der Parodontitis

Die Suche nach genetischen Aspekten, die im Zusammenhang mit dem parodontalen Erkrankungsrisiko stehen, hat, wie sich in der Literatur widerspiegelt, deutlich zugenommen. Besonders an der Pathogenese beteiligte Mechanismen wurden untersucht.

In hochindustrialisierten Ländern sind bis zu 40% der Bevölkerung von Zahnfleischerkrankungen im Sinne einer chronischen Parodontitis betroffen (Pihlstrom et al., 2005). Sowohl durch Ergebnisse von Zwillingsstudien (Michalowicz, 1994, Michalowicz et al., 2000), als auch durch klinische Untersuchungen, die sich mit der familiären Häufung von Parodontopathien beschäftigen (Boughman et al., 1990, Marazita et al., 1994), haben wissenschaftliche Untersuchungen schon früher auf hereditäre Komponenten von Parodontalerkrankungen hingewiesen. Die Unterschiede in Verlauf und Schwere von Parodontalerkrankungen gehen bis zu 50% auf genetische Faktoren zurück (Dannewitz, 2009). Die Beobachtung, wonach die Zerstörung des Zahnhalteapparates durch eine unangemessen starke Immunantwort verursacht wird, hat dazu geführt, dass im Rahmen von Assoziationsstudien speziell nach Polymorphismen in Genen gesucht wurde, die für Funktionen der Immunabwehr kodieren. Dabei stehen Polymorphismen in pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, Zytokinrezeptoren sowie Immunglobulinrezeptoren, Hormonen und Hormonrezeptoren, HLA-Antigenen oder dem Formylpeptid- (fMLP-) Rezeptor im Vordergrund (Yoshie et al., 2007). Die Suche nach den auslösenden Genen ist aber schwierig, da die Parodontitis mit ihrem kontinuierlichen phänotypischen Erscheinungsbild keine Erkrankung ist, die durch Mutation eines einzelnen Genes entsteht. Es sind wahrscheinlich viele Polymorphismen in unterschiedlichen Gensequenzen beteiligt, die sich in ihrer Wirkung addieren und somit das Krankheitsbild mitbestimmen. Dass für bestimmte Krankheiten Anfälligkeitsunterschiede in Abhängigkeit vom Genotyp auftreten basiert, wie bereits erwähnt, hauptsächlich auf Ergebnissen von direkten Assoziationsstudien, die in der Regel Zusammenhänge zwischen SNPs und der Parodontitiserkrankung untersuchen. Als potenziell mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis

assoziierte Kandidatengene kommen diejenigen in Betracht, die für Proteine kodieren, welche in die Pathogenese der Parodontitis involviert sind oder für die eine Assoziation mit anderen entzündlichen Erkrankungen bekannt sind (Folwaczny, 2012b).

6.2.1 Polymorphismen in Zytokingenen

Da es sich bei der Parodontitis um entzündliche Vorgänge handelt, wurden die genetischen Auslöser verstärkt im Bereich der Gene für Entzündungsmediatoren gesucht. Die Interleukine und deren Rezeptoren gelten dabei als besonders attraktiv. *Stashenko et al.* beschrieben, wie die Zytokine IL-1 und TNF- α vom Wirt als Reaktion auf eindringende Mikroorganismen freigesetzt werden und somit die Knochenresorption steigern (Stashenko et al., 1987, Stashenko et al., 1991b). 1997 schrieben *Kornmann et al.* in einer Studie über IL-1 Genvarianten und Parodontitis: „*This study demonstrates that specific genetic markers, that have been associated with increased IL-1 production, are a strong indicator of susceptibility to severe periodontitis in adults.*“ (Kornman et al., 1997). Erneute Untersuchungen von Interleukin-1 α und -1 β ergaben jedoch sehr widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs mit Parodontalerkrankungen (Taylor et al., 2004). *Cullinan et al.* konnten eine Interaktion des Interleukin-1 Genotyps mit Alter, Rauchverhalten und Infektionen durch *Porphyromonas gingivalis* beobachten (Cullinan et al., 2001). *Cattabriga et al.* hingegen widersprachen dieser These teilweise. Auch bei der genetischen Untersuchung anderer Zytokine wie zum Beispiel TNF α , TGF β , IL2 und IL4 sind in der Literatur sehr widersprüchliche Ergebnisse zu finden. Ein Beispiel für diese Widersprüchlichkeit decken diverse Fall-Kontrollstudien von TNF α auf. Die Position-380 dieses Gens zum Beispiel, wurde nur in einer tschechischen Population mit der chronischen Parodontitis in Verbindung gebracht (Fassmann et al., 2003), nicht jedoch mit dänischen, polnischen, schwedischen oder amerikanischen Kaukasiern (Donati et al., 2005, Galbraith et al., 1999, Shapira et al., 2001, Chiu et

al., 2005). In einer deutschen Population konnten hingegen Assoziationen in der Untergruppe nachgewiesen werden (Folwaczny et al., 2004b).

6.2.2 Polymorphismen in Fcγ-Rezeptor Genen

Da sich Fcγ-Rezeptoren an IgG-Moleküle binden, die eingedrungene Mikroorganismen markiert haben, stellen sie ein wichtiges Bindeglied zwischen der humoralen und der zellulären Immunabwehr dar. Hauptsächlich in der Gingiva und in der gingivalen Sulkusflüssigkeit werden IgG vermittelte Immunreaktionen dieses Typs gegen pathogene Bakterien beobachtet (Horino, 1988). Für eine Reihe von Fcγ-R Polymorphismen konnten Assoziationen mit der chronischen Form der Parodontitis gezeigt werden (Loos et al., 2003, Yamamoto et al., 2004, Kobayashi et al., 2001, Meisel et al., 2001, Chai et al., 2010).

Auf der anderen Seite konnten andere Arbeitsgruppen keinen signifikanten Zusammenhang von Fcγ-R Polymorphismen und dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis bei Kaukasiern herstellen (Kobayashi et al., 1997, Yoshie et al., 2007). Gründe hierfür sind neben den oft zu geringen Fallzahlen der ausgewählten Studienpopulationen auch die nicht sorgfältig ausgewählten Kandidatengene.

Auch in Studien zum Fcγ-Rezeptor ergaben sich sehr heterogene Forschungsergebnisse, die wahrscheinlich durch unterschiedliche klinische Klassifizierung von Parodontopathien der untersuchten Kollektive entstanden sind (Chai et al., 2010).

6.2.3 Polymorphismen in HLA Genen

Das HLA-System (Humanes Leukozyten Antigen-System) ist ein Beispiel für hochpolymorphe Genorte. Es wird auch als Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) bezeichnet und besteht aus einer Vielzahl von

Genen. Beim Menschen befindet es sich auf Chromosom 6. Bei der T-Zell-medierten Immunreaktion eines Organismus auf parodontal pathogene Keime spielt der Haupthistokompatibilitätskomplex im Bereich der Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle (Schütt, 2009). *Zinkernagel* et al. konnten zeigen, dass die polymorphe Natur des HLA-Systems direkten Einfluss auf das Antigen-Bindungsvermögen und damit auf den Erfolg der T-Zell-Antwort hat (Zinkernagel and Doherty, 1997).

Dennoch konnten auch in diesem Zusammenhang keine konsistenten Ergebnisse erzielt werden. Die teilweise sehr unterschiedlichen Resultate beruhen zumeist auf der Anwendung unterschiedlicher Untersuchungsmethoden, nicht einheitlicher Populationsgruppen und unzuverlässiger Genotypisierungen. Auch für statistische Auswertungen zu geringe und in der parodontalen Diagnose inhomogen zusammengesetzte Patientengruppen, liefern uneinheitliche Ergebnisse. Zudem wurden die Kontrollgruppen hinsichtlich der parodontalen Diagnose häufig sehr undifferenziert ausgewählt. In der Literatur finden sich zudem deutlich mehr Studien über aggressive Parodontitisformen (Firatli et al., 1996, Takashiba et al., 1999, Roshna et al., 2006, Hodge et al., 1999), als Untersuchungen an Patienten mit chronischer Parodontitis (Stabholz et al., 2010, Stein et al., 2008).

Da die klare Abgrenzung zwischen gesund und krank in Bezug auf die chronische Parodontitis nur unter Berücksichtigung von vielen Parametern möglich ist, wird es auch weiterhin schwierig bleiben, geeignete Personengruppen für derartige Studien zu rekrutieren. Gerade solche Faktoren wie Stress, Umwelteinflüsse, Rauchen und ungesunde Ernährung beeinflussen erwiesenermaßen die Ergebnisse richtungsweisend. Eine Forschungsgruppe untermauerte dieses Problem der Homogenität der Stichprobe, indem sie aus 174 weltweit publizierten Assoziationsstudien 12 Studien auswählte, die allen Kriterien entsprachen. Dabei fanden sie heraus, dass für chronische Parodontitis und HLA Polymorphismen keinerlei signifikante Assoziationen bestehen (Stein et al., 2008). Für die aggressive Parodontitis hingegen fanden sie sowohl positive als auch negative Assoziationen und schlossen daraus, dass zumindest für kaukasische Populationen HLA-A9 und HLAB15 Prädispositionsfaktoren und HLA-A2 und HLA-B5 Schutzfaktoren für aggressive Parodontitis darstellen könnten.

6.3 Korrelation von DMBT1 mit anderen entzündlichen Erkrankungen

Wie bereits ausgeführt, ist DMBT1 (*Deleted in Malignant Brain Tumors 1*) ein Glykoprotein und gehört zur Gruppe B der Familie der *scavenger receptor cysteine-rich* (SRCR)-Proteine. Das zugehörige Gen DMBT1, das sich auf dem Chromosom 10q26.13 befindet, wurde zunächst als potentiell Tumor-suppressor-Gen in Gehirntumoren (Medulloblastom, Glioblastom multiforme) gefunden (Mollenhauer et al., 1999, Mollenhauer et al., 1997). Später konnte es auch in diversen anderen epithelialen Tumoren beobachtet werden, u.a. in Tumoren der Lunge, des Magens, des Ösophagus, des Colons, der Mamma und der Haut (Wu et al., 1999, Blackburn et al., 2007, Tchatchou et al., 2010). Es wurde berichtet, dass die Proteine *salivary agglutinin* (SAG) und *Glykoprotein-340* (gp-340) verschiedene alternative Splicing-Formen von DMBT1 sind (Tino and Wright, 1999, Prakobphol et al., 2000, Ligtenberg et al., 2001). Als Teil der angeborenen Immunabwehr kann DMBT1 gram-positive und gram-negative Bakterien agglutinieren. DMBT1 interagiert mit Komponenten des angeborenen Immunsystems wie *surfactant protein A* und *D*, sowie sekretorisches IgA, und dem Komplementfaktor C1q (Mitoma et al., 2001, Ligtenberg et al., 2004, End et al., 2005). DMBT1 übernimmt außerdem Funktionen bei der Differenzierung von Epithelien und Stammzellen sowie bei regenerativen Prozessen.

In Schleimhautbiopsien von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa konnte in den entzündeten Bereichen eine stark hochregulierte Expression von DMBT1 festgestellt werden. Dabei korrelierte die Höhe der DMBT1-Expression positiv mit dem Grad der Krankheitsaktivität (Renner et al., 2007, Rosenstiel et al., 2007). Im Rahmen einer bakteriellen Endokarditis konnte ebenfalls eine erhöhte Ausschüttung des Proteins DMBT1 in den Bakterienkolonien auf den betroffenen Herzklappen nachgewiesen werden. Die DMBT1-Expression korreliert zudem mit der Virulenz der Endokarditis auslösenden Bakterien (Muller et al., 2009).

6.4 Hypothesen zur Rolle der DMBT1- Polymorphismen in der Pathogenese der chronischen Parodontitis

DMBT1 reguliert als extrazelluläres Matrix-Protein Differenzierungsprozesse in Epithel- und Stammzellen. Es bindet als lumenal sezerniertes Protein ein breites Spektrum von Gram-Positiven und Gram-Negativen Bakterien, wie z.B. *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, Streptokokken und Salmonellen sowie HI- und Influenza A-Viren (Bikker et al., 2002). DMBT1 ist mit einem „salivary agglutinin“ bekannten Speichelprotein identisch, das bereits vor 28 Jahren von *Rundegren et al.* als „Anti Karies Faktor“ untersucht wurde. Die Forscher konnten beweisen, dass SAG mit *Streptococcus mutans* calciumabhängig agglutiniert und somit eine wichtige Rolle für die Kariesprophylaxe spielt (Ericson and Rundegren, 1983, Carlen et al., 1998, Rosan et al., 1982, Stenudd et al., 2001). Über Kariesbakterien hinaus agglutiniert DMBT1 aber noch diverse andere Krankheitserreger und verhindert somit Infektionen (Bikker et al., 2002, Bikker et al., 2004, Prakobphol et al., 2000).

Das erklärt auch, warum sich DMBT1 und sein Genprodukt, das Protein DMBT1, in Körperhöhlräumen und auf Körperoberflächen nachweisen lässt, die in Kontakt mit der Umwelt stehen. Außerdem erklärt es, warum es sich in vielen Körperflüssigkeiten und auch im Speichel findet, wo DMBT1 eine Rolle bei der Abwehr von parodontalen Krankheitserregern spielen könnte (Ericson and Rundegren, 1983, Holmskov et al., 1997, Schulz et al., 2002, Gronborg et al., 2004, Madsen et al., 2010). Wird jedoch das DMBT1-Gen zum Beispiel durch SNPs verändert und liegt somit als weniger effektiv arbeitendes Protein vor, könnte eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionskrankheiten, wie die chronische Parodontitis die Folge sein. Es ist zudem möglich und wissenschaftlich bestätigt, dass durch das unzureichend arbeitende Protein DMBT1 selbst, ein erleichtertes Eindringen von Mikroorganismen über Epithelien möglich ist (Rosenstiel et al., 2007, Renner et al., 2007, Madsen et al., 2010). Die Konsequenz daraus ist, dass Entzündungen des Zahnfleisches über den akuten Zustand hinweg anhalten, möglicherweise so lange, bis im chronisch entzündeten Zahnhalteapparat ein irreversibler Verlust von parodontalem Gewebe anzutreffen ist. *Jan Mollenhauer* et al. fanden heraus, dass DMBT1 auch die Kontakte von Zellen mit ihrem Untergrund, der extrazellulären Matrix vermitteln

(Madsen et al., 2010). Solche Kontakte sind essentiell für die Entwicklung, Teilung und die Wanderung von Zellen sowie für Wundheilungsprozesse. Eine reibungslos ablaufende Wundheilung zählt zu den epithelialen Schutzmechanismen und ist besonders wichtig, wenn Infektionen und Entzündungen im parodontalen Gewebe vorhanden sind. Das ständige Anschalten von Wundheilungsprozessen im Parodontium, könnte ohne ein intaktes DMBT1 Gen bzw. Protein ein Nährboden für die Entstehung der chronischen Parodontitis sein (Madsen et al., 2010).

6.5 Vergleich der Genotyp- und Allelverteilung der untersuchten Polymorphismen mit Referenzpopulationen und Daten des internationalen HapMap Projekts

Im Rahmen des internationalen HapMap-Projekts sind genetische Variationen aus unterschiedlichen Populationen katalogisiert (<http://www.hapmap.org/>). In der nachfolgenden Tabelle 6.5a werden die Genotyp- und Allelfrequenzen, sowie die Minor-Allel-Frequenzen (MAF) aus der eigenen Kontrollgruppe für jeden der sieben SNPs mit den im Rahmen des Hapmap-Projektes ermittelten SNPs verglichen. Dazu wurde der Vergleich mit einer Population ähnlichen ethnischen Hintergrunds durchgeführt (Nordamerikanische Individuen europäischer Abstammung). Zusätzlich werden die Allel- und Genotypenfrequenzen der drei von Renner bereits typisierten SNPs (rs3113236, rs2981745 und rs1052715) verglichen. Die Studienpopulation in der Arbeit von Renner war ebenfalls kaukasischen Herkunft (Renner et al., 2007).

SNP	Genotyp/ Allel	Frequenzen aus der eigenen Kontrollgruppe		Frequenzen bei Individuen aus HapMap		Frequenzen der Kontrollgruppe aus Studie von Renner (Renner et al., 2007)	
		(%)	n (MAF)	(%)	n (MAF)	(%)	n (MAF)
rs2981745	TT	11,4	762 (0,325)	nicht vorhanden		9,1	275 (0,29)
	TC	42,3				40,7	
	CC	46,3				50,2	
	T	32,5				29,0	
rs2981778	AA	11,2	762 (0,328)	8,3	60 (0,325)		
	AG	43,0		48,3			
	GG	45,7		43,3			
	A	32,8		32,5			
rs11523871	CC	11,3	762 (0,326)	8,6	60 (0,336)		
	CA	42,7		50,0			
	AA	46,1		41,4			
	C	32,6		33,6			
rs3013236	CC	11,4	762 (0,424)	8,3	58 (0,325)	6,8	236 (0,260)
	CT	42,0		48,3		39,0	
	TT	46,6		43,3		54,2	
	C	42,4		32,5		26,0	
rs2981804	AA	23,6	762 (0,534)	30,0	60 (0,533)		
	AG	45,9		46,7			
	GG	30,4		23,3			
	G	53,4		53,3			
rs2277244	TT	0	762 (0,029)	0	57 (0,018)		
	TC	5,9		3,5			
	CC	94,1		96,5			
	T	2,9		1,8			
rs1052715	GG	18,6	762 (0,419)	18,3	60 (0,442)	23,1	242 (0,48)
	GA	46,7		51,7		49,6	
	AA	34,6		30,0		27,3	
	G	41,9		44,2		48,0	

Tabelle 6.5a: Vergleich der Genotypfrequenzen und der Frequenzen des selteneren Allels zwischen den eigenen Kontrollen, den Individuen aus dem HapMap-Projekt (Nordamerikanische Individuen europäischer Abstammung) und der Kontrollgruppe mit kaukasischen Herkunft aus der Studie von Renner (Renner et al., 2007).

Bei der Betrachtung der „*minor allele frequency*“ (MAF), mit der man die Häufigkeit beschreibt mit der das seltenere Allel in einer Population auftritt, zeigen sich im Vergleich der eigenen Kontrollgruppe für jeden der sieben SNPs mit den im Rahmen des Hapmap-Projektes ermittelten SNPs keine nennenswerten Unterschiede. Je höher jedoch die MAF ausfällt, desto größer ist der krankheitsfördernde Effekt.

Auch der Vergleich (Tabelle 6.5b) der Genotypfrequenzen der eigenen Kontrollgruppe mit einer anderen Studie zu DMBT1 einer Population mit deutschem beziehungsweise kaukasisch genetischem Hintergrund (Tchatchou et al., 2010) und Daten des internationalen HapMap Projekts für die SNPs rs2981745 und rs11523871 lässt keine großen Abweichungen der Frequenzen erkennen.

SNP	Genotyp/ Allel	Frequenzen aus der eigenen Kontrollgruppe		Frequenzen bei Individuen aus HapMap		Frequenzen der Kontrollgruppe (40-50J.) aus Studie von Tchatchou (Tchatchou et al., 2010)	
		(%)	n	(%)	n	(%)	n
rs2981745	TT	11,4	762	nicht vorhanden		10,7	478
	TC	42,3				38,3	
	CC	46,3				51,0	
rs11523871	CC	11,3	762	8,6	60	9,0	189
	CA	42,7		50,0		48,1	
	AA	46,1		41,4		42,9	

Tabelle 6.5b: Vergleich der Genotypfrequenzen zwischen den eigenen Kontrollen, den Individuen aus dem HapMap- Projekt und der Kontrollgruppe (Alter:40-50 Jahre) aus der Studie von Tchatchou (Tchatchou et al., 2010).

Durch diese Vergleiche wird deutlich, dass die Frequenzverteilung in drei zum Vergleich herangezogenen Kontrollgruppen weitestgehend übereinstimmen. Bei dem SNP rs2981804 fallen kleinere Unterschiede in den Allelfrequenzen auf. Für diesen Polymorphismus wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine stark signifikante Assoziation im *DMBT1*-Gen im Vergleich mit dem Krankheitsbild der chronischen Parodontitis und der Kontrollpopulation gefunden ($p < 0,0001$). Verantwortlich für

diese Abweichungen könnten zum einen die geringeren Fallzahlen des HapMap sein und zum anderen kann eine Populationsstratifizierung ursächlich sein. Auch wenn versucht wurde, zum Vergleich der Kontrollindividuen möglichst ähnlicher genetischer Abstammung heranzuziehen, ist dies bei unterschiedlichen Studien nicht immer zu gewährleisten. Bei den drei Gruppen handelt es sich zum einen um Individuen süddeutscher Abstammung als auch um Menschen „nordeuropäischer Abstammung“ und zum anderen bei Renner um nicht näher bezeichnete „Kaukasier“ (Renner et al., 2007). In Populationen aus größeren geographischen Räumen findet sich üblicherweise eine größere genetische Heterogenität, als bei Kollektiven kleinerer räumlicher Gebiete.

7 Zusammenfassung

Multifaktorielle Erkrankungen wie die chronische Parodontitis werden durch ein komplexes Zusammenwirken genetischer Varianten und exogener Risikofaktoren, wie Rauchen, Stress und unzureichende Mundhygiene verursacht. Die individuelle Entzündungsneigung ist nicht ausschließlich durch die Pathogenität des Biofilms zu erklären, sondern wird maßgeblich durch genetische Polymorphismen in relevanten Genen der Immunantwort mitbestimmt.

Das DMBT1-Gen bzw. sein Protein gehört zur Superfamilie der SRCR-Gene und spielt eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Durch seine Fähigkeit bei der Abwehr von Bakterien und Viren vor allem in Schleimhäuten, ist es maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Integrität von Epithelien beteiligt. Es wird angenommen, dass DMBT1 Funktionen in der Entwicklung der oralen Immuntoleranz, in der Zelldifferenzierung und in der Tumorgenese ausübt. Durch seine Funktion als extrazelluläres Matrix-Protein regelt es Differenzierungsprozesse in Epithel- und Stammzellen und bindet als lumenal sezerniertes Protein außerdem ein breites Spektrum von Gram-Positiven und Gram-Negativen Bakterien. Mutationen im DMBT1-Gen können zu Dysregulationen in der Expression von DMBT1 führen. Die daraus resultierende Störung der Schleimhautbarriere, erleichtert angreifenden Parodontitisbakterien das Eindringen ins Parodontium. Das DMBT1-Gen kommt im Hinblick auf diese Funktionen als pathogenetisch wirksames Kandidatengen für die chronische Parodontitis in Frage.

Um den Einfluss von sogenannten genetischen Polymorphismen im DMBT1 bei chronischer Parodontitis zu untersuchen, wurden die Genotypen und Allelfrequenzen von sieben ausgewählten SNPs (rs2981745, rs3013236, rs1052715, rs2981778, rs11253871, rs2981804 und 2277244) des DMBT1-Gens von 388 Patienten mit chronischer Parodontitis und 762 gesunden, nicht verwandten Kontrollindividuen bestimmt und verglichen. Die ausgewählten SNPs sind über das gesamte DMBT1-Gen, einschließlich regulatorischer Sequenzen verteilt. Die Genotypisierung der insgesamt aus 1150 Individuen bestehenden Studienpopulation, wurde mittels Real-time PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die Validität der Methode wurde durch stichprobenartige Sequenzierung der DNA-Proben überprüft und bestätigt. Die ermittelten Genotyp-, Allel- und Haplotypfrequenzen wurden

miteinander verglichen. Die statistische Auswertung der Daten ergab in der Genotypverteilung der beiden Polymorphismen DMBT1 (rs11523871) und DMBT1 (rs2981804) eine signifikante Assoziation mit dem Phänotyp der chronischen Parodontitis. Für die anderen fünf Polymorphismen ergaben sich keine signifikanten Assoziationen. Zusätzlich konnten starke Assoziationen zwischen mehreren 2-Punkt Haplotypen im *DMBT1*-Gen und der chronischen Parodontitis nachgewiesen werden. Die stärkste Assoziation lieferte der Haplotyp CT aus den SNPs rs11523871 und rs3013236. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben Hinweise, dass der Einzelnukleotidpolymorphismus DMBT1 (rs11523871) ätiopathologischen Einfluss auf die Manifestation der chronischen Parodontitis bei Menschen mit kaukasischer beziehungsweise süddeutscher genetischer Abstammung haben könnte.

8 Abkürzungen und Begriffe

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter- (10^{-6})
A.a	Actinobacillus actinomycetemcomitans
CNV	copy number variant
CP	chronische Parodontitis
DMBT1	Deleted in malignant Brain Tumors- Gen
DMBT1 ^{GP340}	Glykoprotein 340/ dmbt1-Isoform
DMBT1 ^{SAG}	Salivary agglutinin/ dmbt1- Isoform
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
F.n.	Fusobacterium nucleatum
GWA	Genom- weite Assoziationsstudien
HIV-I	Humanes Immunsdefizienz Virus I
HLA	humane Leukozytenantigen-System
IAV	Influenza A Virus
IL	Interleukin
LC480	Light Cycler®480 von Roche Diagnostics
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-2bp	Mac 2-binding protein
MAF	Minor allele frequency
MARCO	macrophage receptor with collagenous structure
MHC	major histocompatibility complex
MSR1	macrophage scavenger receptor
NFκβ	nuklear Factor κβ
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
P.g.	Prophyromonas gingivalis
P.i.	Prevotella intermedia
RT- PCR	real-time PCR
Sek	Sekunden
SNP	Single Nukleotid Polymorphism

SRCR	scavenger receptor cystein-rich
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T.f.	Tannerella forsythensis
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α , β	Tumornekrosefaktor- α , β
VNTR	variable number tandem repeat

9 Literaturverzeichnis

- AAP, A. A. O. P. 2000. Parameter on periodontitis associated with systemic conditions. *J Periodontol*, 71, 876-9.
- AAP, A. A. O. P. 2001. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis, and other clinical conditions. *J Periodontol*, 72, 1790-800.
- ADUSE-OPOKU, J., MUIR, J., SLANEY, J. M., RANGARAJAN, M. & CURTIS, M. A. 1995. Characterization, genetic analysis, and expression of a protease antigen (PrpRI) of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infect Immun*, 63, 4744-54.
- ALBERS, V. H., LONING, T., LISBOA, B.P. 1997. Biochemische und morphologische Untersuchungen über die Prostaglandine E und F der normalen und entzündlichen veränderten Gingiva. *Dtsch Zahnarztl Z*, 34, 440-443.
- ALPAGOT, T., DUZGUNES, N., WOLFF, L. F. & LEE, A. 2004. Risk factors for periodontitis in HIV patients. *J Periodontal Res*, 39, 149-57.
- ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4, 1-6.
- ARUFFO, A., BOWEN, M. A., PATEL, D. D., HAYNES, B. F., STARLING, G. C., GEBE, J. A. & BAJORATH, J. 1997. CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today*, 18, 498-504.
- BALDI, D., IZZOTTI, A., BONICA, P., PERA, P. & PULLIERO, A. 2009. Degenerative periodontal-diseases and oral osteonecrosis: the role of gene-environment interactions. *Mutat Res*, 667, 118-31.
- BARTSCH, M. 2006. Untersuchungen zur Charakterisierung der Gewebedestruktion bei Parodontitis marginalis. <http://ub-ed.ub.uni-greifswald.de/opus/volltexte/2006/52/>.
- BICKEBÖLLER, H., FISCHER, C. 2007. Einführung in die genetische Epidemiologie. *Springer-Verlag, Berlin*.
- BIKKER, F. J., LIGTENBERG, A. J., END, C., RENNER, M., BLAICH, S., LYER, S., WITTIG, R., VAN'T HOF, W., VEERMAN, E. C., NAZMI, K., DE BLIECK-HOGERVORST, J. M., KIOSCHIS, P., NIEUW AMERONGEN, A. V., POUSTKA, A. & MOLLENHAUER, J. 2004. Bacteria binding by DMBT1/SAG/gp-340 is confined to the VEVLXXXXW motif in its scavenger receptor cysteine-rich domains. *J Biol Chem*, 279, 47699-703.
- BIKKER, F. J., LIGTENBERG, A. J., NAZMI, K., VEERMAN, E. C., VAN'T HOF, W., BOLSCHER, J. G., POUSTKA, A., NIEUW AMERONGEN, A. V. & MOLLENHAUER, J. 2002. Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *J Biol Chem*, 277, 32109-15.
- BIOQUE, G., CRUSIUS, J. B., KOUTROUBAKIS, I., BOUMA, G., KOSTENSE, P. J., MEUWISSEN, S. G. & PENA, A. S. 1995. Allelic polymorphism in IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) genes in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 102, 379-83.

- BLACKBURN, A. C., HILL, L. Z., ROBERTS, A. L., WANG, J., AUD, D., JUNG, J., NIKOLCHEVA, T., ALLARD, J., PELTZ, G., OTIS, C. N., CAO, Q. J., RICKETTS, R. S., NABER, S. P., MOLLENHAUER, J., POUSTKA, A., MALAMUD, D. & JERRY, D. J. 2007. Genetic mapping in mice identifies DMBT1 as a candidate modifier of mammary tumors and breast cancer risk. *Am J Pathol*, 170, 2030-41.
- BLAND, J. M. & ALTMAN, D. G. 1995. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ*, 310, 170.
- BOACKLE, R. J., CONNOR, M. H. & VESELY, J. 1993. High molecular weight non-immunoglobulin salivary agglutinins (NIA) bind C1Q globular heads and have the potential to activate the first complement component. *Mol Immunol*, 30, 309-19.
- BOFFETTA, P., MCLAUGHLIN, J. K., LA VECCHIA, C., TARONE, R. E., LIPWORTH, L. & BLOT, W. J. 2008. False-positive results in cancer epidemiology: a plea for epistemological modesty. *J Natl Cancer Inst*, 100, 988-95.
- BORK, P. & BECKMANN, G. 1993. The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol*, 231, 539-45.
- BORRELL, L. N. & PAPAPANOU, P. N. 2005. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 132-58.
- BOUGHMAN, J. A., ASTEMBORSKI, J. A. & BLITZER, M. G. 1990. Early onset periodontal disease: a genetics perspective. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1, 89-99.
- BRAIDOTTI, P., NUCIFORO, P. G., MOLLENHAUER, J., POUSTKA, A., PELLEGRINI, C., MORO, A., BULFAMANTE, G., COGGI, G., BOSARI, S. & PIETRA, G. G. 2004. DMBT1 expression is down-regulated in breast cancer. *BMC Cancer*, 4, 46.
- BRANNSTROM, A., SANKALA, M., TRYGGVASON, K. & PIKKARAINEN, T. 2002. Arginine residues in domain V have a central role for bacteria-binding activity of macrophage scavenger receptor MARCO. *Biochem Biophys Res Commun*, 290, 1462-9.
- BREX, M. C., FROHLICHER, I., GEHR, P. & LANG, N. P. 1988a. Stereological observations on long-term experimental gingivitis in man. *J Clin Periodontol*, 15, 621-7.
- BREX, M. C., GAUTSCHI, M., GEHR, P. & LANG, N. P. 1987. Variability of histologic criteria in clinically healthy human gingiva. *J Periodontal Res*, 22, 468-72.
- BREX, M. C., LEHMANN, B., SIEGWART, C. M., GEHR, P. & LANG, N. P. 1988b. Observations on the initial stages of healing following human experimental gingivitis. A clinical and morphometric study. *J Clin Periodontol*, 15, 123-9.
- BROWN, L. J. & LOE, H. 1993. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2, 57-71.
- CAPLIN, B. E., RASMUSSEN, R.P., BERNARD, P.S., WITTEWER, C.T. 1999. Light Cycler hybridization probes-the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection *Biochemica* 1, 1-5.

- CARDULLO, R. A., AGRAWAL, S., FLORES, C., ZAMECNIK, P. C. & WOLF, D. E. 1988. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 8790-4.
- CARLEN, A., BRATT, P., STENUDD, C., OLSSON, J. & STROMBERG, N. 1998. Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *J Dent Res*, 77, 81-90.
- CARLEN, A. & OLSSON, J. 1995. Monoclonal antibodies against a high-molecular-weight agglutinin block adherence to experimental pellicles on hydroxyapatite and aggregation of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 74, 1040-7.
- CARLEN, A., OLSSON, J. & RAMBERG, P. 1996. Saliva mediated adherence, aggregation and prevalence in dental plaque of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and *Actinomyces* spp, in young and elderly humans. *Arch Oral Biol*, 41, 1133-40.
- CHAI, L., SONG, Y. Q., ZEE, K. Y. & LEUNG, W. K. 2010. SNPs of Fc-gamma receptor genes and chronic periodontitis. *J Dent Res*, 89, 705-10.
- CHARON, J. A., LUGER, T. A., MERGENHAGEN, S. E. & OPPENHEIM, J. J. 1982. Increased thymocyte-activating factor in human gingival fluid during gingival inflammation. *Infect Immun*, 38, 1190-5.
- CHIU, Y. F., CHUANG, L. M., HSIAO, C. F., HUNG, Y. J., LIN, M. W., CHEN, Y. T., GROVE, J., JORGENSEN, E., QUERTERMOUS, T., RISCH, N. & HSIUNG, C. A. 2005. An autosomal genome-wide scan for loci linked to pre-diabetic phenotypes in nondiabetic Chinese subjects from the Stanford Asia-Pacific Program of Hypertension and Insulin Resistance Family Study. *Diabetes*, 54, 1200-6.
- CLAUDINO, M., TROMBONE, A. P., CARDOSO, C. R., FERREIRA, S. B., JR., MARTINS, W., JR., ASSIS, G. F., SANTOS, C. F., TREVILATTO, P. C., CAMPANELLI, A. P., SILVA, J. S. & GARLET, G. P. 2008. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol*, 84, 1565-73.
- COLHOUN, H. M., MCKEIGUE, P. M. & DAVEY SMITH, G. 2003. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet*, 361, 865-72.
- CRAANDIJK, J., VAN KRUGTEN, M. V., VERWEIJ, C. L., VAN DER VELDEN, U. & LOOS, B. G. 2002. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*, 29, 28-34.
- CROUCHER, P. J., MASCHERETTI, S., HAMPE, J., HUSE, K., FRENZEL, H., STOLL, M., LU, T., NIKOLAUS, S., YANG, S. K., KRAWCZAK, M., KIM, W. H. & SCHREIBER, S. 2003. Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet*, 11, 6-16.
- CROUCHER, R., MARCENES, W. S., TORRES, M. C., HUGHES, F. & SHEIHAM, A. 1997. The relationship between life-events and periodontitis. A case-control study. *J Clin Periodontol*, 24, 39-43.
- CULLINAN, M. P., WESTERMAN, B., HAMLET, S. M., PALMER, J. E., FADDY, M. J., LANG, N. P. & SEYMOUR, G. J. 2001. A longitudinal study of interleukin-1

- gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol*, 28, 1137-44.
- CUMMINS, J. E., CHRISTENSEN, L., LENNOX, J. L., BUSH, T. J., WU, Z., MALAMUD, D., EVANS-STRICKFADEN, T., SIDDIG, A., CALIENDO, A. M., HART, C. E. & DEZZUTTI, C. S. 2006. Mucosal innate immune factors in the female genital tract are associated with vaginal HIV-1 shedding independent of plasma viral load. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 22, 788-95.
- DAHLEN, G. 2002. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol 2000*, 28, 206-39.
- DANNEWITZ, B., EICKHOLZ, P. 2009. Check-Up-Medizin, Prävention von Krankheiten, Zahnerhalt und Parodontitisprophylaxe. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*.
- DBSNP 2009. the NCBI database of genetic variation.
- DEAS, D. E., MACKEY, S. A. & MCDONNELL, H. T. 2003. Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontol 2000*, 32, 82-104.
- DEVLIN, B. & RISCH, N. 1995. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics*, 29, 311-22.
- DI GIOVINE, F. S., TAKHSH, E., BLAKEMORE, A. I. & DUFF, G. W. 1992. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). *Hum Mol Genet*, 1, 450.
- DIEHL, S. R., WANG, Y., BROOKS, C. N., BURMEISTER, J. A., CALIFANO, J. V., WANG, S. & SCHENKEIN, H. A. 1999. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 70, 418-30.
- DOI, T., HIGASHINO, K., KURIHARA, Y., WADA, Y., MIYAZAKI, T., NAKAMURA, H., UESUGI, S., IMANISHI, T., KAWABE, Y., ITAKURA, H. & ET AL. 1993. Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem*, 268, 2126-33.
- DONATI, M., BERGLUNDH, T., HYTONEN, A. M., HAHN-ZORIC, M., HANSON, L. A. & PADYUKOV, L. 2005. Association of the -159 CD14 gene polymorphism and lack of association of the -308 TNFA and Q551R IL-4RA polymorphisms with severe chronic periodontitis in Swedish Caucasians. *J Clin Periodontol*, 32, 474-9.
- EBERSOLE, J. L. 2003. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000*, 31, 135-66.
- END, C., LYER, S., RENNER, M., STAHL, C., DITZER, J., HOLLOSCHI, A., KUHN, H. M., FLAMMANN, H. T., POUSTKA, A., HAFNER, M., MOLLENHAUER, J. & KIOSCHIS, P. 2005. Generation of a vector system facilitating cloning of DMBT1 variants and recombinant expression of functional full-length DMBT1. *Protein Expr Purif*, 41, 275-86.
- ERICSON, T. & RUNDEGREN, J. 1983. Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *Eur J Biochem*, 133, 255-61.

- FASSMANN, A., HOLLA, L. I., BUCKOVA, D., VASKU, A., ZNOJIL, V. & VANEK, J. 2003. Polymorphisms in the +252(A/G) lymphotoxin-alpha and the -308(A/G) tumor necrosis factor-alpha genes and susceptibility to chronic periodontitis in a Czech population. *J Periodontal Res*, 38, 394-9.
- FIEBIG, A., JEPSEN, S., LOOS, B. G., SCHOLZ, C., SCHAFER, C., RUHLING, A., NOTHNAGEL, M., EICKHOLZ, P., VAN DER VELDEN, U., SCHENCK, K., SCHREIBER, S. & GROSSNER-SCHREIBER, B. 2008. Polymorphisms in the interleukin-1 (IL1) gene cluster are not associated with aggressive periodontitis in a large Caucasian population. *Genomics*, 92, 309-15.
- FIRATLI, E., KANTARCI, A., CEBECI, I., TANYERI, H., SONMEZ, G., CARIN, M. & TUNCER, O. 1996. Association between HLA antigens and early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, 23, 563-6.
- FOLWACZNY, M. 2012a. Aspekte der Genetik in der Pathogenese der Parodontitis. *Parodontologie*, 23(1), 65-81.
- FOLWACZNY, M. 2012b. Aspekte der Genetik in der Pathogenese der Parodontitis. *Parodontologie 2012*, 23 (1), 65-81.
- FOLWACZNY, M., GLAS, J., TOROK, H. P., FRICKE, K. & FOLWACZNY, C. 2004a. The CD14 -159C-to-T promoter polymorphism in periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31, 991-5.
- FOLWACZNY, M., GLAS, J., TOROK, H. P., MENDE, M. & FOLWACZNY, C. 2004b. Lack of association between the TNF alpha G -308 A promoter polymorphism and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 31, 449-53.
- GALBRAITH, G. M., HENDLEY, T. M., SANDERS, J. J., PALESCH, Y. & PANDEY, J. P. 1999. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 26, 705-9.
- GALBRAITH, G. M., STEED, R. B., SANDERS, J. J. & PANDEY, J. P. 1998. Tumor necrosis factor alpha production by oral leukocytes: influence of tumor necrosis factor genotype. *J Periodontol*, 69, 428-33.
- GEIVELIS, M., TURNER, D. W., PEDERSON, E. D. & LAMBERTS, B. L. 1993. Measurements of interleukin-6 in gingival crevicular fluid from adults with destructive periodontal disease. *J Periodontol*, 64, 980-3.
- GENCO, R. J., KORNMAN, K., WILLIAMS, R., OFFENBACHER, S., ZAMBON, J. J., ISHIKAWA, R., SCHENKEIN, H., SLOTS, J. & SOCRANSKY, S. 1996. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol*, 1, 926-32.
- GLAS, J., TOROK, H. P., SCHNEIDER, A., BRUNNLER, G., KOPP, R., ALBERT, E. D., STOLTE, M. & FOLWACZNY, C. 2004. Allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early gastric cancer. *J Clin Oncol*, 22, 4746-52.
- GREENSTEIN, G. & HART, T. C. 2002. A critical assessment of interleukin-1 (IL-1) genotyping when used in a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis. *J Periodontol*, 73, 231-47.
- GRONBORG, M., BUNKENBORG, J., KRISTIANSEN, T. Z., JENSEN, O. N., YEO, C. J., HRUBAN, R. H., MAITRA, A., GOGGINS, M. G. & PANDEY, A. 2004. Comprehensive proteomic analysis of human pancreatic juice. *J Proteome Res*, 3, 1042-55.

- GRONLUND, J., VITVED, L., LAUSEN, M., SKJODT, K. & HOLMSKOV, U. 2000. Cloning of a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule (M160) expressed by human macrophages. *J Immunol*, 165, 6406-15.
- GROSSI, S. G., GENCO, R. J., MACHTEI, E. E., HO, A. W., KOCH, G., DUNFORD, R., ZAMBON, J. J. & HAUSMANN, E. 1995. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*, 66, 23-9.
- HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 2001. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*, 28, 377-88.
- HALLBACH, J. 2006. Klinische Chemie und Hämatologie für den Eistieg. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 2. Auflage, 15-17.
- HAMPE, J., CUTHBERT, A., CROUCHER, P. J., MIRZA, M. M., MASCHERETTI, S., FISHER, S., FRENZEL, H., KING, K., HASSELMAYER, A., MACPHERSON, A. J., BRIDGER, S., VAN DEVENTER, S., FORBES, A., NIKOLAUS, S., LENNARD-JONES, J. E., FOELSCH, U. R., KRAWCZAK, M., LEWIS, C., SCHREIBER, S. & MATHEW, C. G. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, 357, 1925-8.
- HAYDEN, M. J., NGUYEN, T. M., WATERMAN, A. & CHALMERS, K. J. 2008. Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. *BMC Genomics*, 9, 80.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J. & WILLIAMS, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- HELLWIG, E., KLIMEK, J., ATTIN, TH. 2003. Einführung in die Zahnerhaltung. *Urban&Fischer Verlag*.
- HERNANDEZ, M., MARTINEZ, B., TEJERINA, J. M., VALENZUELA, M. A. & GAMONAL, J. 2007. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 34, 729-35.
- HINDS, D. A., KLOEK, A. P., JEN, M., CHEN, X. & FRAZER, K. A. 2006. Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Genet*, 38, 82-5.
- HODGE, P. J., RIGGIO, M. P. & KINANE, D. F. 1999. No association with HLA-DQB1 in European Caucasians with early-onset periodontitis. *Tissue Antigens*, 54, 205-7.
- HODGE, P. J., RIGGIO, M. P. & KINANE, D. F. 2001. Failure to detect an association with IL1 genotypes in European Caucasians with generalised early onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28, 430-6.
- HOFFMANN, F. 2007. Roche Science Publication: Genes and Health.
- HOFFMANN, T., MIKE JOHN, THOMAS, KERSCHBAUM, WOLFGANG MICHEELIS, PETER POTTHOFF, ELMAR REICH, URSULA REIS, FLORIAN REITER, ULRICH SCHIFFNER UND ERNST SCHROEDER 2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). *Deutscher Zahnärzte Verlag 2006*.
- HOLMSKOV, U., LAWSON, P., TEISNER, B., TORNOE, I., WILLIS, A. C., MORGAN, C., KOCH, C. & REID, K. B. 1997. Isolation and characterization of a new

- member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein-D binding molecule. *J Biol Chem*, 272, 13743-9.
- HOLMSKOV, U., MOLLENHAUER, J., MADSEN, J., VITVED, L., GRONLUND, J., TORNOE, I., KLIEM, A., REID, K. B., POUSTKA, A. & SKJODT, K. 1999. Cloning of gp-340, a putative opsonin receptor for lung surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10794-9.
- HORINO, K. 1988. [Correlation between serum and GCF IgG titers against *Bacteroides*, *Actinobacillus* and status of periodontal disease]. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 30, 452-65.
- HUYNH-BA, G., LANG, N. P., TONETTI, M. S. & SALVI, G. E. 2007. The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol*, 34, 305-17.
- HYMAN, J. J. & REID, B. C. 2003. Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *J Clin Periodontol*, 30, 230-7.
- IHGS-CONSORTIUM, I. H. G. S. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 931-45.
- INAGAKI, K., KUROSU, Y., SAKANO, M., YAMAMOTO, G., KIKUCHI, T., NOGUCHI, T., YANO, H., IZAWA, H. & HACHIYA, Y. 2007. [Oral osteoporosis: a review and its dental implications]. *Clin Calcium*, 17, 157-63.
- IOANNIDIS, J. P. 2006. Commentary: grading the credibility of molecular evidence for complex diseases. *Int J Epidemiol*, 35, 572-8; discussion 593-6.
- JANDINSKI, J. J., STASHENKO, P., FEDER, L. S., LEUNG, C. C., PEROS, W. J., RYNAR, J. E. & DEASY, M. J. 1991. Localization of interleukin-1 beta in human periodontal tissue. *J Periodontol*, 62, 36-43.
- KARCH, H., FLEMMIG, T. F. & EHMER, U. 2003. Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie. *Deutsche Gesellschaft für Parodontologie Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK)*.
- KINANE, D. F. 1999. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*, 4, 54-64.
- KINANE, D. F. 2001. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 25, 8-20.
- KINANE, D. F., DARBY, I. B., SAID, S., LUOTO, H., SORSA, T., TIKANOJA, S. & MANTYLA, P. 2003. Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodontal Res*, 38, 400-4.
- KINANE, D. F. & HART, T. C. 2003. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 14, 430-49.
- KINANE, D. F., MOONEY, J., MACFARLANE, T. W. & MCDONALD, M. 1993. Local and systemic antibody response to putative periodontopathogens in patients with chronic periodontitis: correlation with clinical indices. *Oral Microbiol Immunol*, 8, 65-8.
- KINANE, D. F., SHIBA, H. & HART, T. C. 2005. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 39, 91-117.

- KIRCH, W. 1994. Innere medizin-Der Risikopatient in der Zahnärztlichen praxis. *NHanser, München*, 153-156.
- KNIPPERS, R. 2006. Molekulare Genetik. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*.
- KOBAYASHI, T., WESTERDAAL, N. A., MIYAZAKI, A., VAN DER POL, W. L., SUZUKI, T., YOSHIE, H., VAN DE WINKEL, J. G. & HARA, K. 1997. Relevance of immunoglobulin G Fc receptor polymorphism to recurrence of adult periodontitis in Japanese patients. *Infect Immun*, 65, 3556-60.
- KOBAYASHI, T., YAMAMOTO, K., SUGITA, N., VAN DER POL, W. L., YASUDA, K., KANEKO, S., VAN DE WINKEL, J. G. & YOSHIE, H. 2001. The Fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, 72, 1324-31.
- KORNMAN, K. S., CRANE, A., WANG, H. Y., DI GIOVINE, F. S., NEWMAN, M. G., PIRK, F. W., WILSON, T. G., JR., HIGGINBOTTOM, F. L. & DUFF, G. W. 1997. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 24, 72-7.
- KORNMAN, K. S. & DI GIOVINE, F. S. 1998. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol*, 3, 327-38.
- KRALL, E. A. 2001. The periodontal-systemic connection: implications for treatment of patients with osteoporosis and periodontal disease. *Ann Periodontol*, 6, 209-13.
- LAY, M. J. & WITTEWER, C. T. 1997. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem*, 43, 2262-7.
- LETTRE, G., PALMER, C. D., YOUNG, T., EJEBE, K. G., ALLAYEE, H., BENJAMIN, E. J., BENNETT, F., BOWDEN, D. W., CHAKRAVARTI, A., DREISBACH, A., FARLOW, D. N., FOLSOM, A. R., FORNAGE, M., FORRESTER, T., FOX, E., HAIMAN, C. A., HARTIALA, J., HARRIS, T. B., HAZEN, S. L., HECKBERT, S. R., HENDERSON, B. E., HIRSCHHORN, J. N., KEATING, B. J., KRITCHEVSKY, S. B., LARKIN, E., LI, M., RUDOCK, M. E., MCKENZIE, C. A., MEIGS, J. B., MENG, Y. A., MOSLEY, T. H., NEWMAN, A. B., NEWTON-CHEH, C. H., PALTOO, D. N., PAPANICOLAOU, G. J., PATTERSON, N., POST, W. S., PSATY, B. M., QASIM, A. N., QU, L., RADER, D. J., REDLINE, S., REILLY, M. P., REINER, A. P., RICH, S. S., ROTTER, J. I., LIU, Y., SHRADER, P., SISCOVICK, D. S., TANG, W. H., TAYLOR, H. A., TRACY, R. P., VASAN, R. S., WATERS, K. M., WILKS, R., WILSON, J. G., FABSITZ, R. R., GABRIEL, S. B., KATHIRESAN, S. & BOERWINKLE, E. 2011. Genome-wide association study of coronary heart disease and its risk factors in 8,090 African Americans: the NHLBI CARE Project. *PLoS Genet*, 7, e1001300.
- LEWIS, J. R., KONDA, V. & RUBIN, D. T. 2009. Genetic testing for inflammatory bowel disease: focus group analysis of patients and family members. *Genet Test Mol Biomarkers*, 13, 495-503.
- LEWONTIN, R. C. 1964. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics*, 49, 49-67.
- LEWONTIN, R. C. 1988. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, 120, 849-52.

- LIGTENBERG, A. J., BIKKER, F. J., DE BLIECK-HOGERVORST, J. M., VEERMAN, E. C. & NIEUW AMERONGEN, A. V. 2004. Binding of salivary agglutinin to IgA. *Biochem J*, 383, 159-64.
- LIGTENBERG, T. J., BIKKER, F. J., GROENINK, J., TORNOE, I., LETH-LARSEN, R., VEERMAN, E. C., NIEUW AMERONGEN, A. V. & HOLMSKOV, U. 2001. Human salivary agglutinin binds to lung surfactant protein-D and is identical with scavenger receptor protein gp-340. *Biochem J*, 359, 243-8.
- LINDHE, J., RANNEY, R., LAMSTER, I. 1999. Consensus report: Chronic periodontitis
AnnPeriodontol 4.
- LOHMUELLER, K. E., PEARCE, C. L., PIKE, M., LANDER, E. S. & HIRSCHHORN, J. N. 2003. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*, 33, 177-82.
- LOOS, B. G., JOHN, R. P. & LAINE, M. L. 2005. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 159-79.
- LOOS, B. G., LEPPERS-VAN DE STRAAT, F. G., VAN DE WINKEL, J. G. & VAN DER VELDEN, U. 2003. Fcgamma receptor polymorphisms in relation to periodontitis. *J Clin Periodontol*, 30, 595-602.
- LOWE, C. E., COOPER, J. D., CHAPMAN, J. M., BARRATT, B. J., TWELLS, R. C., GREEN, E. A., SAVAGE, D. A., GUJA, C., IONESCU-TIRGOVISTE, C., TUOMILEHTO-WOLF, E., TUOMILEHTO, J., TODD, J. A. & CLAYTON, D. G. 2004. Cost-effective analysis of candidate genes using htSNPs: a staged approach. *Genes Immun*, 5, 301-5.
- MADSEN, J., MOLLENHAUER, J. & HOLMSKOV, U. 2010. Review: Gp-340/DMBT1 in mucosal innate immunity. *Innate Immun*, 16, 160-7.
- MARAZITA, M. L., BURMEISTER, J. A., GUNSOLLEY, J. C., KOERTGE, T. E., LAKE, K. & SCHENKEIN, H. A. 1994. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogeneity in early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 65, 623-30.
- MARSH, P., MARTIN, M.V. 2003. Orale Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*
- MAYER, W. E., TICHY, H. 1995. A cDNA clone from the sea lamprey *Petromyzon marinus* coding for a scavenger receptor Cys-rich (SRCR) domain protein. *Gene*, 164, 267-71.
- MCGOVERN, D. P., JONES, M. R., TAYLOR, K. D., MARCIANTE, K., YAN, X., DUBINSKY, M., IPPOLITI, A., VASILIAUSKAS, E., BEREL, D., DERKOWSKI, C., DUTRIDGE, D., FLESHNER, P., SHIH, D. Q., MELMED, G., MENGESHA, E., KING, L., PRESSMAN, S., HARITUNIAN, T., GUO, X., TARGAN, S. R. & ROTTER, J. I. 2010. Fucosyltransferase 2 (FUT2) non-secretor status is associated with Crohn's disease. *Hum Mol Genet*, 19, 3468-76.
- MEISEL, P., CARLSSON, L. E., SAWAF, H., FANGHAENEL, J., GREINACHER, A. & KOCHER, T. 2001. Polymorphisms of Fc gamma-receptors RIIa, RIIa, and RIIb in patients with adult periodontal diseases. *Genes Immun*, 2, 258-62.

- MEISEL, P., SIEGEMUND, A., GRIMM, R., HERRMANN, F. H., JOHN, U., SCHWAHN, C. & KOCHER, T. 2003. The interleukin-1 polymorphism, smoking, and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study. *J Dent Res*, 82, 189-93.
- MICHALOWICZ, B. S. 1994. Genetic and heritable risk factors in periodontal disease. *J Periodontol*, 65, 479-88.
- MICHALOWICZ, B. S., AEPPLI, D., VIRAG, J. G., KLUMP, D. G., HINRICHS, J. E., SEGAL, N. L., BOUCHARD, T. J., JR. & PIHLSTROM, B. L. 1991. Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol*, 62, 293-9.
- MICHALOWICZ, B. S., DIEHL, S. R., GUNSOLLEY, J. C., SPARKS, B. S., BROOKS, C. N., KOERTGE, T. E., CALIFANO, J. V., BURMEISTER, J. A. & SCHENKEIN, H. A. 2000. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*, 71, 1699-707.
- MICHEELIS, W., SCHIFFNER, U. 2006. Vierte deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). *Deutscher Ärzte-Verlag, Köln* IDZ Materialienreihe 502.
- MITOMA, M., OHO, T., SHIMAZAKI, Y. & KOGA, T. 2001. Inhibitory effect of bovine milk lactoferrin on the interaction between a streptococcal surface protein antigen and human salivary agglutinin. *J Biol Chem*, 276, 18060-5.
- MOLLENHAUER, J., DEICHMANN, M., HELMKE, B., MULLER, H., KOLLENDER, G., HOLMSKOV, U., LIGTENBERG, T., KREBS, I., WIEMANN, S., BANTEL-SCHAAL, U., MADSEN, J., BIKKER, F., KLAUCK, S. M., OTTO, H. F., MOLDENHAUER, G. & POUSTKA, A. 2003. Frequent downregulation of DMBT1 and galectin-3 in epithelial skin cancer. *Int J Cancer*, 105, 149-57.
- MOLLENHAUER, J., HELMKE, B., MEDINA, D., BERGMANN, G., GASSLER, N., MULLER, H., LYER, S., DIEDRICHS, L., RENNER, M., WITTIG, R., BLAICH, S., HAMANN, U., MADSEN, J., HOLMSKOV, U., BIKKER, F., LIGTENBERG, A., CARLEN, A., OLSSON, J., OTTO, H. F., O'MALLEY, B. & POUSTKA, A. 2004. Carcinogen inducibility in vivo and down-regulation of DMBT1 during breast carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 39, 185-94.
- MOLLENHAUER, J., HELMKE, B., MULLER, H., KOLLENDER, G., KREBS, I., WIEMANN, S., HOLMSKOV, U., MADSEN, J., OTTO, H. F. & POUSTKA, A. 2002a. An integrative model on the role of DMBT1 in epithelial cancer. *Cancer Detect Prev*, 26, 266-74.
- MOLLENHAUER, J., HELMKE, B., MULLER, H., KOLLENDER, G., LYER, S., DIEDRICHS, L., HOLMSKOV, U., LIGTENBERG, T., HERBERTZ, S., KREBS, I., WIEMANN, S., MADSEN, J., BIKKER, F., SCHMITT, L., OTTO, H. F. & POUSTKA, A. 2002b. Sequential changes of the DMBT1 expression and location in normal lung tissue and lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 35, 164-9.
- MOLLENHAUER, J., HERBERTZ, S., HELMKE, B., KOLLENDER, G., KREBS, I., MADSEN, J., HOLMSKOV, U., SORGER, K., SCHMITT, L., WIEMANN, S., OTTO, H. F., GRONE, H. J. & POUSTKA, A. 2001. Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is a versatile mucin-like molecule likely to play a differential role in digestive tract cancer. *Cancer Res*, 61, 8880-6.
- MOLLENHAUER, J., HERBERTZ, S., HOLMSKOV, U., TOLNAY, M., KREBS, I., MERLO, A., SCHRODER, H. D., MAIER, D., BREITLING, F., WIEMANN, S.,

- GRONE, H. J. & POUSTKA, A. 2000. DMBT1 encodes a protein involved in the immune defense and in epithelial differentiation and is highly unstable in cancer. *Cancer Res*, 60, 1704-10.
- MOLLENHAUER, J., HOLMSKOV, U., WIEMANN, S., KREBS, I., HERBERTZ, S., MADSEN, J., KIOSCHIS, P., COY, J. F. & POUSTKA, A. 1999. The genomic structure of the DMBT1 gene: evidence for a region with susceptibility to genomic instability. *Oncogene*, 18, 6233-40.
- MOLLENHAUER, J., MULLER, H., KOLLENDER, G., LYER, S., DIEDRICHS, L., HELMKE, B., HOLMSKOV, U., LIGTENBERG, T., HERBERTZ, S., KREBS, I., MADSEN, J., BIKKER, F., SCHMITT, L., WIEMANN, S., SCHEURLLEN, W., OTTO, H. F., VON DEIMLING, A. & POUSTKA, A. 2002c. The SRCR/SID region of DMBT1 defines a complex multi-allele system representing the major basis for its variability in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 35, 242-55.
- MOLLENHAUER, J., WIEMANN, S., SCHEURLLEN, W., KORN, B., HAYASHI, Y., WILGENBUS, K. K., VON DEIMLING, A. & POUSTKA, A. 1997. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet*, 17, 32-9.
- MOONEY, J. & KINANE, D. F. 1994. Humoral immune responses to *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 9, 321-6.
- MOORE, H., SUMMERBELL, C., HOOPER, L., CRUICKSHANK, K., VYAS, A., JOHNSTONE, P., ASHTON, V. & KOPELMAN, P. 2004. Dietary advice for treatment of type 2 diabetes mellitus in adults. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004097.
- MOREIRA, P. R., COSTA, J. E., GOMEZ, R. S., GOLLOB, K. J. & DUTRA, W. O. 2007a. The IL1A (-889) gene polymorphism is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res*, 42, 23-30.
- MOREIRA, P. R., LIMA, P. M., SATHLER, K. O., IMANISHI, S. A., COSTA, J. E., GOMES, R. S., GOLLOB, K. J. & DUTRA, W. O. 2007b. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol*, 148, 119-26.
- MORI, M., SHIRAISHI, T., TANAKA, S., YAMAGATA, M., MAFUNE, K., TANAKA, Y., UEO, H., BARNARD, G. F. & SUGIMACHI, K. 1999. Lack of DMBT1 expression in oesophageal, gastric and colon cancers. *Br J Cancer*, 79, 211-3.
- MORRISON, T. B., WEIS, J. J. & WITTEWER, C. T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24, 954-8, 960, 962.
- MOUGHAL, N. A., ADONOGIANAKI, E., THORNHILL, M. H. & KINANE, D. F. 1992. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J Periodontal Res*, 27, 623-30.
- MUCCI, L. A., BJORKMAN, L., DOUGLASS, C. W. & PEDERSEN, N. L. 2005. Environmental and heritable factors in the etiology of oral diseases--a population-based study of Swedish twins. *J Dent Res*, 84, 800-5.

- MULLER, H., RENNER, M., HELMKE, B. M., END, C., WEISS, C., POESCHL, J. & MOLLENHAUER, J. 2009. Deleted in Malignant Brain Tumors 1 is up-regulated in bacterial endocarditis and binds to components of vegetations. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 138, 725-32.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- MURKEN, J., GRIMM, T., HOLINSKI-FEDER, E. 2006. Humangenetik. *Thieme-Verlag, Stuttgart, New York*.
- NIBALI, L., TONETTI, M. S., READY, D., PARKAR, M., BRETT, P. M., DONOS, N. & D'AIUTO, F. 2008. Interleukin-6 polymorphisms are associated with pathogenic bacteria in subjects with periodontitis. *J Periodontol*, 79, 677-83.
- NIKOLOPOULOS, G. K., DIMOU, N. L., HAMODRAKAS, S. J. & BAGOS, P. G. 2008. Cytokine gene polymorphisms in periodontal disease: a meta-analysis of 53 studies including 4178 cases and 4590 controls. *J Clin Periodontol*, 35, 754-67.
- OFFENBACHER, S., FARR, D. H. & GOODSON, J. M. 1981. Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 8, 359-67.
- OKADA, H. & MURAKAMI, S. 1998. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 248-66.
- OLIVER, R. C., BROWN, L. J. & LOE, H. 1998. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol*, 69, 269-78.
- PAGE, R. C. 1998. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol*, 3, 108-20.
- PAGE, R. C. 1999. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. *J Periodontal Res*, 34, 331-9.
- PAGE, R. C., BEATTY, P. & WALDROP, T. C. 1987. Molecular basis for the functional abnormality in neutrophils from patients with generalized prepubertal periodontitis. *J Periodontal Res*, 22, 182-3.
- PAGE, R. C. & KORNMAN, K. S. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 14, 9-11.
- PAGE, R. C., OFFENBACHER, S., SCHROEDER, H. E., SEYMOUR, G. J. & KORNMAN, K. S. 1997. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, 14, 216-48.
- PAGE, R. C., SIMS, T. J., GEISLER, F., ALTMAN, L. C. & BAAB, D. A. 1984. Abnormal leukocyte motility in patients with early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*, 19, 591-4.
- PAHLER, S., BLUMBACH, B., MULLER, I. & MULLER, W. E. 1998. Putative multiadhesive protein from the marine sponge *Geodia cydonium*: cloning of the cDNA encoding a fibronectin-, an SRCR-, and a complement control protein module. *J Exp Zool*, 282, 332-43.
- PAPAPANOU, P. N., NEIDERUD, A. M., SANDROS, J. & DAHLEN, G. 2001. Interleukin-1 gene polymorphism and periodontal status. A case-control study. *J Clin Periodontol*, 28, 389-96.

- PARKHILL, J. M., HENNIG, B. J., CHAPPLE, I. L., HEASMAN, P. A. & TAYLOR, J. J. 2000. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol*, 27, 682-9.
- PASSARGE, E. 2004. Taschenatlas der Genetik. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*.
- PHAROAH, P. D., DUNNING, A. M., PONDER, B. A. & EASTON, D. F. 2004. Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer*, 4, 850-60.
- PIHLSTROM, B. L., MICHALOWICZ, B. S. & JOHNSON, N. W. 2005. Periodontal diseases. *Lancet*, 366, 1809-20.
- PRAKOBPHOL, A., XU, F., HOANG, V. M., LARSSON, T., BERGSTROM, J., JOHANSSON, I., FRANGSMYR, L., HOLMSKOV, U., LEFFLER, H., NILSSON, C., BOREN, T., WRIGHT, J. R., STROMBERG, N. & FISHER, S. J. 2000. Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. *J Biol Chem*, 275, 39860-6.
- PRESCHER, N., MAIER, K., MUNJAL, S. K., SORSA, T., BAUERMEISTER, C. D., STRUCK, F. & NETUSCHIL, L. 2007. Rapid quantitative chairside test for active MMP-8 in gingival crevicular fluid: first clinical data. *Ann N Y Acad Sci*, 1098, 493-5.
- RATEITSCHAK, K. H. W., H.F. 2004. Parodontologie. *Thieme Verlag*, 50.
- REED, G. H. & WITWER, C. T. 2004. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*, 50, 1748-54.
- RENGGLI, H. H., MÜHLEMANN, H.R., RATEITSCHAK, K.H. 1984. Parodontologie: gesundes Parodont, Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik, Prophylaxe u. Therapie parodontaler Erkrankungen. *Thieme Stuttgart-New York (1984)*.
- RENNER, M., BERGMANN, G., KREBS, I., END, C., LYER, S., HILBERG, F., HELMKE, B., GASSLER, N., AUTSCHBACH, F., BIKKER, F., STROBEL-FREIDEKIND, O., GRONERT-SUM, S., BENNER, A., BLAICH, S., WITTIG, R., HUDLER, M., LIGTENBERG, A. J., MADSEN, J., HOLMSKOV, U., ANNESE, V., LATIANO, A., SCHIRMACHER, P., AMERONGEN, A. V., D'AMATO, M., KIOSCHIS, P., HAFNER, M., POUSTKA, A. & MOLLENHAUER, J. 2007. DMBT1 confers mucosal protection in vivo and a deletion variant is associated with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 133, 1499-509.
- RESNICK, D., PEARSON, A. & KRIEGER, M. 1994. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci*, 19, 5-8.
- REYNOLDS, J. J. & MEIKLE, M. C. 1997. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000*, 14, 144-57.
- RICHARDS, D. & RUTHERFORD, R. B. 1988. The effects of interleukin 1 on collagenolytic activity and prostaglandin-E secretion by human periodontal-ligament and gingival fibroblast. *Arch Oral Biol*, 33, 237-43.
- RINK, L. & KIRCHNER, H. 1996. Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. *Int Arch Allergy Immunol*, 111, 199-209.

- ROLLE, M., MAYR, A. 2007. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 627.
- ROMANELLI, R., MANCINI, S., LASCHINGER, C., OVERALL, C. M., SODEK, J. & MCCULLOCH, C. A. 1999. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect Immun*, 67, 2319-26.
- ROMERO, A., ROMAO, M. J., VARELA, P. F., KOLLN, I., DIAS, J. M., CARVALHO, A. L., SANZ, L., TOPFER-PETERSEN, E. & CALVETE, J. J. 1997. The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat Struct Biol*, 4, 783-8.
- ROSAN, B., APPELBAUM, B., GOLUB, E., MALAMUD, D. & MANDEL, I. D. 1982. Enhanced saliva-mediated bacterial aggregation and decreased bacterial adhesion in caries-resistant versus caries-susceptible individuals. *Infect Immun*, 38, 1056-9.
- ROSENSTIEL, P., SINA, C., END, C., RENNER, M., LYER, S., TILL, A., HELLMIG, S., NIKOLAUS, S., FOLSCH, U. R., HELMKE, B., AUTSCHBACH, F., SCHIRMACHER, P., KIOSCHIS, P., HAFNER, M., POUSTKA, A., MOLLENHAUER, J. & SCHREIBER, S. 2007. Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion. *J Immunol*, 178, 8203-11.
- ROSHNA, T., THOMAS, R., NANDAKUMAR, K. & BANERJEE, M. 2006. A case-control study on the association of human leukocyte antigen-A*9 and -B*15 alleles with generalized aggressive periodontitis in an Indian population. *J Periodontol*, 77, 1954-63.
- RUNDEGREN, J. 1986. Calcium-dependent salivary agglutinin with reactivity to various oral bacterial species. *Infect Immun*, 53, 173-8.
- RUNDEGREN, J. & ARNOLD, R. R. 1987. Differentiation and interaction of secretory immunoglobulin A and a calcium-dependent parotid agglutinin for several bacterial strains. *Infect Immun*, 55, 288-92.
- RUNDEGREN, J. & ERICSON, T. 1981. Effect of calcium on reactions between a salivary agglutinin and a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *J Oral Pathol*, 10, 269-75.
- SALVI, G. E., CAROLLO-BITTEL, B. & LANG, N. P. 2008. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol*, 35, 398-409.
- SALVI, G. E., LAWRENCE, H. P., OFFENBACHER, S. & BECK, J. D. 1997. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*, 14, 173-201.
- SANDERINK, R. B. A., BERNHARDT, H., KNOKE, M., MEYER, J., WEBER, C., WEIGER, R. 2004. Curriculum Orale Mikrobiologie und Immunolog. Quintessenz Verlags-GmbH. Berlin.
- SCHULZ, B. L., OXLEY, D., PACKER, N. H. & KARLSSON, N. G. 2002. Identification of two highly sialylated human tear-fluid DMBT1 isoforms: the major high-molecular-mass glycoproteins in human tears. *Biochem J*, 366, 511-20.
- SCHÜTT, C., BÖCKER, B. 2009. Grundwissen Immunologie. . Springer-Verlag, Berlin.

- SEYMOUR, G. J. 1991. Importance of the host response in the periodontium. *J Clin Periodontol*, 18, 421-6.
- SEYMOUR, G. J., POWELL, R. N. & AITKEN, J. F. 1983. Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. *J Periodontol*, 54, 522-8.
- SHAPIRA, L., STABHOLZ, A., RIECKMANN, P. & KRUSE, N. 2001. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*, 36, 183-6.
- SHAPIRA, L., WILENSKY, A. & KINANE, D. F. 2005. Effect of genetic variability on the inflammatory response to periodontal infection. *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6, 72-86.
- SHEIHAM, A. & NETUVELI, G. S. 2002. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol 2000*, 29, 104-21.
- SHIRODARIA, S., SMITH, J., MCKAY, I. J., KENNETT, C. N. & HUGHES, F. J. 2000. Polymorphisms in the IL-1A gene are correlated with levels of interleukin-1alpha protein in gingival crevicular fluid of teeth with severe periodontal disease. *J Dent Res*, 79, 1864-9.
- SIGUSCH, B., EICK, S., PFISTER, W., KLINGER, G. & GLOCKMANN, E. 2001. Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28, 162-7.
- SILVA, N., DUTZAN, N., HERNANDEZ, M., DEZEREGA, A., RIVERA, O., AGUILLON, J. C., ARAVENA, O., LASTRES, P., POZO, P., VERNAL, R. & GAMONAL, J. 2008. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*, 35, 206-14.
- SINGER, R. E. & BUCKNER, B. A. 1981. Butyrate and propionate: important components of toxic dental plaque extracts. *Infect Immun*, 32, 458-63.
- SINOWATZ, F., KOLLE, S. & TOPFER-PETERSEN, E. 2001. Biosynthesis and expression of zona pellucida glycoproteins in mammals. *Cells Tissues Organs*, 168, 24-35.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., GOODSON, J. M. & LINDHE, J. 1984. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 11, 21-32.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., SMITH, C. & DUFF, G. W. 2000. Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*, 27, 810-8.
- SOGA, Y., NISHIMURA, F., OHYAMA, H., MAEDA, H., TAKASHIBA, S. & MURAYAMA, Y. 2003. Tumor necrosis factor-alpha gene (TNF-alpha) -1031/-863, -857 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with severe adult periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*, 30, 524-31.
- SOLINAS, A., BROWN, L. J., MCKEEN, C., MELLOR, J. M., NICOL, J., THELWELL, N. & BROWN, T. 2001. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res*, 29, E96.
- SOUTHERLAND, J. H., TAYLOR, G. W., MOSS, K., BECK, J. D. & OFFENBACHER, S. 2006. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontol 2000*, 40, 130-43.

- STABHOLZ, A., SOSKOLNE, W. A. & SHAPIRA, L. 2010. Genetic and environmental risk factors for chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000, 53, 138-53.
- STASHENKO, P., DEWHIRST, F. E., PEROS, W. J., KENT, R. L. & AGO, J. M. 1987. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*, 138, 1464-8.
- STASHENKO, P., FUJIYOSHI, P., OBERNESSER, M. S., PROSTAK, L., HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 1991a. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 18, 548-54.
- STASHENKO, P., JANDINSKI, J. J., FUJIYOSHI, P., RYNAR, J. & SOCRANSKY, S. S. 1991b. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol*, 62, 504-9.
- STEIN, J. M., MACHULLA, H. K., SMEETS, R., LAMPERT, F. & REICHERT, S. 2008. Human leukocyte antigen polymorphism in chronic and aggressive periodontitis among Caucasians: a meta-analysis. *J Clin Periodontol*, 35, 183-92.
- STENUDD, C., NORDLUND, A., RYBERG, M., JOHANSSON, I., KALLESTAL, C. & STROMBERG, N. 2001. The association of bacterial adhesion with dental caries. *J Dent Res*, 80, 2005-10.
- STERNE, J. A. & DAVEY SMITH, G. 2001. Sifting the evidence-what's wrong with significance tests? *BMJ*, 322, 226-31.
- STRYER, L. & HAUGLAND, R. P. 1967. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58, 719-26.
- SUNDQVIST, G., CARLSSON, J., HERRMANN, B. & TARNVIK, A. 1985. Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol*, 19, 85-94.
- TACHI, Y., SHIMPUKU, H., NOSAKA, Y., KAWAMURA, T., SHINOHARA, M., UEDA, M., IMAI, H. & OHURA, K. 2003. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Life Sci*, 73, 3313-21.
- TAKASHIBA, S. & NARUISHI, K. 2006. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000, 40, 94-106.
- TAKASHIBA, S., OHYAMA, H., OYAIZU, K., KOGOE-KATO, N. & MURAYAMA, Y. 1999. HLA genetics for diagnosis of susceptibility to early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*, 34, 374-8.
- TANNER, A. C., KENT, R., JR., KANASI, E., LU, S. C., PASTER, B. J., SONIS, S. T., MURRAY, L. A. & VAN DYKE, T. E. 2007. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. *J Clin Periodontol*, 34, 917-30.
- TAYLOR, J. J., PRESRAW, P. M. & DONALDSON, P. T. 2004. Cytokine gene polymorphism and immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol* 2000, 35, 158-82.
- TCHATCHOU, S., RIEDEL, A., LYER, S., SCHMUTZHARD, J., STROBEL-FREIDEKIND, O., GRONERT-SUM, S., MIETAG, C., D'AMATO, M., SCHLEHE, B., HEMMINKI, K., SUTTER, C., DITSCH, N., BLACKBURN, A., HILL, L. Z., JERRY, D. J., BUGERT, P., WEBER, B. H., NIEDERACHER, D.,

- ARNOLD, N., VARON-MATEEVA, R., WAPPENSCHMIDT, B., SCHMUTZLER, R. K., ENGEL, C., MEINDL, A., BARTRAM, C. R., MOLLENHAUER, J. & BURWINKEL, B. 2010. Identification of a DMBT1 polymorphism associated with increased breast cancer risk and decreased promoter activity. *Hum Mutat*, 31, 60-6.
- THOMAS, D. C. & CLAYTON, D. G. 2004. Betting odds and genetic associations. *J Natl Cancer Inst*, 96, 421-3.
- TINO, M. J. & WRIGHT, J. R. 1999. Glycoprotein-340 binds surfactant protein-A (SP-A) and stimulates alveolar macrophage migration in an SP-A-independent manner. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20, 759-68.
- TONETTI, M. S. & MOMBELLI, A. 1999. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*, 4, 39-53.
- TYAGI, S., BRATU, D. P. & KRAMER, F. R. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*, 16, 49-53.
- UITTO, V. J., OVERALL, C. M. & MCCULLOCH, C. 2003. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*, 31, 77-104.
- VAN DYKE, T. E., SCHWEINEBRATEN, M., CIANCIOLA, L. J., OFFENBACHER, S. & GENCO, R. J. 1985. Neutrophil chemotaxis in families with localized juvenile periodontitis. *J Periodontal Res*, 20, 503-14.
- VAN DYKE, T. E. & SHEILESH, D. 2005. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*, 7, 3-7.
- VICTOR, A., ELSÄSSER, A., HOMMEL, G., BLETTNER, M. 2010. Wie bewertet man die p-Wert-Flut? . *Dtsch Arztebl Int* 107(4), 50-56.
- VISSCHER, P. M. & MONTGOMERY, G. W. 2009. Genome-wide association studies and human disease: from trickle to flood. *JAMA*, 302, 2028-9.
- VON AHSEN, N., OELLERICH, M., ARMSTRONG, V. W. & SCHUTZ, E. 1999. Application of a thermodynamic nearest-neighbor model to estimate nucleic acid stability and optimize probe design: prediction of melting points of multiple mutations of apolipoprotein B-3500 and factor V with a hybridization probe genotyping assay on the LightCycler. *Clin Chem*, 45, 2094-101.
- WACTAWSKI-WENDE, J. 2001. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Ann Periodontol*, 6, 197-208.
- WEITKUNAT, R., KAELIN, E., VUILLAUME, G. & KALLISCHNIGG, G. 2010. Effectiveness of strategies to increase the validity of findings from association studies: size vs. replication. *BMC Med Res Methodol*, 10, 47.
- WILSON, M. E., BRONSON, P. M. & HAMILTON, R. G. 1995. Immunoglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*, 63, 1070-5.
- WITTEWER, C. T., HERRMANN, M. G., GUNDRY, C. N. & ELENITOBA-JOHNSON, K. S. 2001. Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25, 430-42.
- WITTEWER, C. T., RIRIE, K. M., ANDREW, R. V., DAVID, D. A., GUNDRY, R. A. & BALIS, U. J. 1997. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22, 176-81.
- WOLFF, L. F., AEPPLI, D. M., PIHLSTROM, B., ANDERSON, L., STOLTENBERG, J., OSBORN, J., HARDIE, N., SHELBURNE, C. & FISCHER, G. 1993. Natural

- distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 20, 699-706.
- WU, W., KEMP, B. L., PROCTOR, M. L., GAZDAR, A. F., MINNA, J. D., HONG, W. K. & MAO, L. 1999. Expression of DMBT1, a candidate tumor suppressor gene, is frequently lost in lung cancer. *Cancer Res*, 59, 1846-51.
- WWW.TIB-MOLBIOL.DE/DE/LIGHTCYCLER/PRINCIPLE/FORMATS.HTML.
- YAMAMOTO, K., KOBAYASHI, T., GROSSI, S., HO, A. W., GENCO, R. J., YOSHIE, H. & DE NARDIN, E. 2004. Association of Fcγ receptor IIa genotype with chronic periodontitis in Caucasians. *J Periodontol*, 75, 517-22.
- YOSHIE, H., KOBAYASHI, T., TAI, H. & GALICIA, J. C. 2007. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000*, 43, 102-32.
- ZAMBON, J. J., GROSSI, S. G., MACHTEI, E. E., HO, A. W., DUNFORD, R. & GENCO, R. J. 1996. Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens. *J Periodontol*, 67, 1050-4.
- ZINKERNAGEL, R. M. & DOHERTY, P. C. 1997. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today*, 18, 14-7.

10 Lebenslauf

11 Danksagung

Mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die kompetente Betreuung und die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit, geht vor allem an meinen Doktorvater Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny.

Mein Dank geht an Herrn Jürgen Glas, für die Unterstützung bei den Arbeiten im Labor und für die Beantwortung aller diesbezüglichen Fragen.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse, danke ich Frau Christiane Wolf, aus der Arbeitsgruppe des MPI-München für statistische Genetik.

Meiner Freundin und Kollegin Emmanuelle Le Bras danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute kooperative Zusammenarbeit.

Frau Brigitte Hackel danke ich für die Beantwortung vieler labortechnischer Fragen und ihren Zuspruch.

Bei Frau Dr. Julia Diegelmann möchte ich mich bedanken, da sie mir in statistischen Fragen tatkräftig zur Seite stand.

Außerordentlich möchte ich den Menschen danken, die mir das alles letztendlich möglich gemacht haben. Für die bedingungslose Unterstützung auf den vielen Wegen, die ich bis zu diesem Punkt gehen musste, bedanke ich mich bei meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären.

Meinem Mann danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen, besonders jedoch während des Studiums und während der Arbeit an dieser Dissertation. Meinen Söhnen Nikolai und Kilian widme ich diese Doktorarbeit. Sie sind meine Freude, mein Stolz und meine Herausforderung.